

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Análisis de expresión de factores pro- inflamatorios e inmunológicos en carcinoma de células de Merkel.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO: Pedro Díaz Pozo

TUTOR: Prof. Dr. Rafael Sirera Pérez

COTUTOR EXTERNO: Dr. José Antonio López Guerrero

Curso Académico: 2017-2018

VALENCIA, 18 de Junio de 2018



Título del TFG:	“Análisis de expresión de factores pro-inflamatorios e inmunológicos en carcinoma de células de Merkel.”
Autor:	Pedro Díaz Pozo
Titulación:	Grado en Biotecnología
Lugar de realización:	Fundación Instituto Valenciano de Oncología
Cotutor externo:	José Antonio López Guerrero
Lugar y Fecha:	Valencia, 18 de Junio de 2018

Resumen

El carcinoma de células de Merkel es un raro y agresivo tumor neuroendocrino cutáneo. Está relacionado con la exposición a radiación ultravioleta y a la infección por el polyomavirus de células de Merkel. A pesar del mal pronóstico, sobre todo si se ha producido metástasis, se están desarrollando nuevas estrategias para su tratamiento, siendo una de las más prometedoras la terapia de inhibición de puntos de control inmunitarios.

En este sentido, la proteína de muerte programada (PD-1) es una de las principales dianas en el tratamiento actual, por lo que en este estudio evaluamos y relacionamos la expresión de genes del sistema inmune con la presencia de esta proteína. Igualmente, el infiltrado linfocitario tiene un valor predictivo tanto en el pronóstico como en el tratamiento de este tumor. Por ello, también se estudió el perfil de expresión inmune relacionándolo con la existencia de marcadores de infiltración, en este caso CD8. Adicionalmente buscamos diferencias de expresión entre tumores delimitados y mal delimitados (infiltrados). Por último, se sabe que la presencia del polyomavirus de células de Merkel en el tumor genera grandes diferencias con respecto a los negativos para dicho virus, por lo que valoramos qué genes inmunitarios están diferencialmente expresados.

En este estudio se analizó tejido tumoral parafinado de 48 pacientes proveniente del biobanco de la Fundación Instituto Valenciano de Oncología (FIVO). Para ello, utilizamos la tecnología HTG EdgeSeq®, que aporta reproducibilidad y evita sesgos durante la preparación de las muestras, permitiendo análisis robustos a partir de cantidades pequeñas de tejido. Posteriormente se secuenció y analizó estadísticamente la expresión génica en función del número de transcritos de cada gen. Obtuvimos un total de 11 genes con expresión diferencial para PD-1 positivos, 1 gen para CD8 positivos, 11 genes para tumores infiltrados y 71 para tumores con infección viral. Adicionalmente pudimos agrupar las muestras en dos clases según la expresión de los 71 genes diferencialmente expresados en la condición de polyomavirus, aunque no se pudo asociar dicha separación con ninguna de las condiciones nombradas.

Palabras clave

Expresión génica, carcinoma, respuesta inmune, HTG EdgeSeq, polyomavirus.

Abstract

Merkel cell carcinoma is a rare and aggressive neuroendocrine skin cancer related to UV radiation and Merkel cell polyomavirus infection. Despite the poor prognostic, especially in metastatic cases, new strategies for treatment are being developed paying special attention to immune checkpoint inhibitors.

In this way, programmed death protein 1 (PD-1) is one of the main targets in current treatment. Therefore, we evaluated and related immune genes expression with the presence of this protein. Similarly, lymphocytic infiltrate has a predictive value both in prognosis and treatment of this tumour. Hence, we also intended to study immune gene expression profile related to the existence of infiltration markers, in this case CD8. Additionally, we looked for differences in expression between delimited and poorly delimited tumours. Finally, it is known that the presence of Merkel cell polyomavirus in the tumour generates large differences compared to virus negative tumours. Thus, an evaluation regarding immune genes expression was addressed.

In this study, 48 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples were used from the biobank at Fundación Instituto Valenciano de Oncología (FIVO). HTG EdgeSeq® technology was used based on its unbiased reproducibility during sample preparation, thus allowing using small starting material. Subsequently, gene expression was sequenced and analysed obtaining the copy number for each gene. Our results showed 11 genes with differential expression in PD-1 positive tumours, 1 gene in CD8 positive, 11 genes in poorly delimited tumours and 71 genes differentially expressed in those with viral infection. Additionally, we were able to sort the samples into two categories according to the expression of the 71 genes obtained from polyomavirus condition, although this separation could not be associated with any of the named conditions.

Key words

Gene expression, carcinoma, immune response, HTG EdgeSeq, polyomavirus.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Carcinoma de células de Merkel	2
1.1.1. Etiología	2
1.1.2. Patogénesis	3
1.1.3. Carcinoma de células de Merkel y polyomavirus	4
1.1.4. Tratamiento	6
1.2. Inmunología	7
1.3. Inmunoterapia	8
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Materiales	11
3.1.1. Pacientes	12
3.1.2. Muestras de tejido parafinado	12
3.1.3. HTG EdgeSeq	12
3.1.4. Amplificación y Secuenciación	13
3.2. Métodos	13
3.2.1. Preparación de la muestra	13
3.2.2. Preparación de la librería	14
3.2.3. Cuantificación y Normalización	16
3.2.4. Secuenciación	17
3.2.5. Análisis Informático	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. PD-1	21
4.2. CD8	24
4.3. Infiltración	26
4.4. Polyomavirus	29
5. CONCLUSIONES	34
6. BIBLIOGRAFÍA	36
7. ANEXO	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto del antígeno LT en tumorigénesis y proliferación del CCM.

Figura 2. Flujo de trabajo del sistema HTG EdgeSeq®.

Figura 3. Proceso de formación de la sonda sintética.

Figura 4. Gráfico de amplificación de la qPCR.

Figura 5. Gráfico de número de lecturas en cada carrera del secuenciador.

Figura 6. Representación de la calidad de secuenciación.

Figura 7. Gráfico PCA para la condición PD-1.

Figura 8. Agrupación de las muestras según la condición PD-1.

Figura 9. Gráfico PCA para la condición CD8.

Figura 10. Agrupación de las muestras según la condición CD8.

Figura 11. Gráfico PCA para la condición infiltración.

Figura 12. Agrupación de las muestras según la condición infiltración.

Figura 13. Gráfico PCA para la condición polyomavirus.

Figura 14. Agrupación de las muestras según la condición polyomavirus.

Figura 15. Agrupación según los 71 genes obtenidos de la condición de polyomavirus.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de las características clinicopatológicas de las muestras.

Tabla 2. Fases y ciclos de la PCR.

Tabla 3. Fases y ciclos de la qPCR.

Tabla 4. Resultados del test de Wald en la condición PD-1.

Tabla 5. Resultados del test de Wald en la condición CD8.

Tabla 6. Resultados del test de Wald en la condición infiltración.

Tabla 7. Resultados del test de Wald en la condición polyomavirus.

Tabla 8. Resultados de la prueba χ^2 .

Tabla A1. 96 posibles combinaciones de *primers forward* con *reverse*

Tabla A2. Primera librería obtenida tras la reacción en el procesador HTG.

Tabla A3. Segunda librería obtenida tras la reacción en el procesador HTG

Tabla A4. Tercera librería obtenida tras la reacción en el procesador HTG

Tabla A5. Primer *pool* de secuenciación con un total de 10 muestras de CCM.

Tabla A6. Segundo *pool* de secuenciación con un total de 13 muestras de CCM.

Tabla A7. Tercer *pool* de secuenciación con un total de 16 muestras de CCM.

Tabla A8. Cuarto *pool* de secuenciación con un total de 9 muestras de CCM.

LISTADO DE ABREVIATURAS

4E-BP1	Factor iniciador de la traducción eucariota
CCM	Carcinoma de células de Merkel
CIITA	Transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad clase II
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
MIG	Monocina inducida por interferón gamma
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2F	Factor de transcripción involucrado en el control del ciclo celular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBXW7	Proteína 7 con dominios F-Box y WD
FFPE	Muestras embebidas y fijadas en parafina
HER2	Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano
HLA	Sistema del antígeno leucocitario humano
IFN-γ	Interferón gamma
IL18BP	Proteína de unión a la interleucina 18
INE	Instituto nacional de estadística
IO	Oncología inmunitaria
LT	Antígeno grande T
MAGEA3	Antígeno 3 asociado a melanoma
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MUC1	Mucina 1 asociada a la membrana
NGS	Secuenciación de nueva generación
OMS	Organización mundial de la salud

PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Proteína de muerte programada 1
PD-L1	Ligando 1 de PD-1
PD-L2	Ligando 2 de PD-1
PEG	Polietilenglicol
pRB	Proteína del retinoblastoma
pVHL	Proteína supresora de tumores Von Hippel–Lindau
PyVCM	Polyomavirus de células de Merkel
qPCR	PCR cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
SCF	Complejo de ubiquitinación
SEOM	Sociedad española de oncología médica
ST	Antígeno pequeño T
SV40	Virus del simio 40
TE	Tampón tris-EDTA
UV	Ultravioleta
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular A
VP1	Proteína mayor de la cápside
VP2	Proteína 2 de la cápside

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad compleja multifactorial con múltiples definiciones. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es “un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; también se habla de «tumores malignos» o «neoplasias malignas». Una característica definitoria del cáncer es la rápida multiplicación de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, un proceso que se denomina «metástasis».”

Desde el punto de vista biológico, el cáncer es un trastorno caracterizado por la alteración del equilibrio entre la proliferación y los mecanismos normales de muerte celular. Como consecuencia se desarrolla un tumor que puede invadir y destruir los tejidos adyacentes, así como diseminarse hacia sitios distantes en los que se forman nuevas colonias. Con frecuencia esto conduce a la muerte del individuo por deterioro de la función de órganos vitales. (Granados García y Herrera Gómez, 2010)

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En 2015 ocasionó 8,8 millones de defunciones, lo que supone casi 1 de cada 6 fallecimientos. (OMS). Por ello, es una de las enfermedades con más importancia a nivel mundial, tratándose de un problema de salud pública que causa una gran pérdida de vidas humanas. El impacto económico del cáncer es sustancial y va en aumento, se estima que en 2010 el coste atribuible a la enfermedad ascendió a US\$ 1.16 billones. (Stewart y Wild, 2014)

Los últimos datos de incidencia, mortalidad y prevalencia a nivel mundial son los estimados por los proyectos EUCAN y GLOBOCAN de la OMS en 2012. En este año hubo 14.1 millones de casos nuevos, así como 32.6 millones de personas viviendo con esta enfermedad. Además, se estima que en los siguientes 20 años la cifra de nuevos casos aumente en un 70%. (informe SEOM, 2018)

Los tumores más frecuentes a nivel mundial en 2012 fueron pulmón, mama, colorrectal, próstata, estómago e hígado, en dicho orden (GLOBOCAN, 2012). En España las cifras también aumentan, con 215.535 casos estimados para el año 2012, 228.482 para el año 2017 y una previsión de 315.413 casos para el año 2035. (informe SEOM, 2018). Los tumores más frecuentemente diagnosticados en España en el año 2017 fueron los de colorrecto, próstata, pulmón, mama, vejiga y estómago.

En España, un 27,5% de las muertes en el 2016 fueron a causa del cáncer (datos comparados con los del Instituto Nacional de Estadística (INE)), siendo la segunda causa de muerte con 112.939 fallecimientos. Se prevé que esta cifra aumente a 156.898 para el año 2035. Los tumores causantes del mayor número de fallecimientos en España en 2016 difieren de los globales del 2012, siendo el primero el de pulmón, seguido del colorrectal y a gran distancia, el de páncreas, el de mama y el de próstata.

El proceso de desarrollo de un tumor maligno se denomina oncogénesis o carcinogénesis. En este sentido, la epidemiología es una gran herramienta en la identificación de posibles causas. Por un lado, hay que discernir entre factores de riesgo, considerados sucesos relacionados con la aparición del cáncer que no suelen ser la causa directa y agentes etiológicos

que son el origen directo de la transformación maligna (Granados García y Herrera Gómez, 2010). Los factores de riesgo también se pueden clasificar en función de si son evitables o no. Únicamente el 5-10% de todos los casos de cáncer se pueden atribuir a defectos genéticos (no modificables), mientras que el 90-95% restante se deben al ambiente y al estilo de vida (modificables). Los factores ambientales incluyen tabaquismo, dieta (comida rápida, carne roja (OMS)), alcohol, exposición a radiación solar, contaminación ambiental, infecciones, estrés, obesidad e inactividad física. Los datos indican que, de todas las muertes por cáncer, entre el 25-30% son debidas al tabaco, solo superadas por las debidas a la dieta con un porcentaje de 30-35%. Las infecciones son responsables del 15-20%, mientras que el porcentaje restante está debido al resto de factores ya mencionados. (Anand *et al.*, 2008).

Otro factor clave, no modificable, es la edad. La mayoría de casos de cáncer ocurren en pacientes con más de 65 años. Se ha comprobado que la incidencia aumenta rápidamente en ambos sexos siendo de 12 a 36 veces superior en individuos mayores de 65 que en individuos entre 25 y 44, mientras que es de 2 a 3 veces superior que en personas de entre 45 y 64. (Caruso, 2004).

El cáncer es una enfermedad que tradicionalmente ha sido clasificada dependiendo de su origen celular y tisular. En cuanto a su tratamiento, se ha seguido una aproximación macroscópica basada en criterios patológicos donde se usan varios ciclos de terapias citotóxicas. Sin embargo, con la llegada de las nuevas tecnologías de secuenciación se ha podido ver que existen diferencias genómicas, transcriptómicas y epigenéticas sustanciales entre los diferentes tipos de tumores. Esto ha permitido mejorar el pronóstico y la supervivencia de muchos tipos tumorales gracias a una mayor respuesta a terapias citotóxicas dirigidas cuando los pacientes son clasificados en función de las características moleculares de sus tumores. Como ejemplo de estas terapias dirigidas tenemos el fármaco imatinib, útil en leucemia mieloide crónica (Druker *et al.*, 2006), terapias dirigidas al receptor HER2 para cáncer de mama, y antagonistas del receptor de estrógenos, también en cáncer de mama. Estos avances moleculares están ayudando a marcar el comienzo de una nueva era en medicina de precisión, que está reorganizando todo el panorama del tratamiento del cáncer.

1.1. Carcinoma de células de Merkel

El carcinoma de células de Merkel (CCM), es un tumor neuroendocrino primario de la piel, poco frecuente y muy agresivo. El 90% de los casos aparecen en áreas expuestas al sol como una placa o nódulo indoloro. Este hecho sugiere que la radiación ultravioleta juega un papel importante en el inicio y desarrollo de este tumor. El CCM también se puede encontrar en otras partes del cuerpo como genitales o el tronco, pero con una considerable menor frecuencia. (Kaae *et al.*, 2010)

1.1.1. Etiología

El análisis de la incidencia del CCM es complicado ya que fue originalmente descrito en 1972 y era confundido con otros tumores. Además, en la primera edición de la clasificación internacional de enfermedades oncológicas, no se asignó códigos morfológicos específicos para el CCM lo que complicó su seguimiento. No fue hasta la segunda edición en 1990 cuando se introdujeron los códigos para carcinoma neuroendocrino y para el CCM. A principios de la década de los 90 diversos estudios señalaban que la incidencia era cercana a 0, lo que sugiere

un registro de la incidencia poco fiable. A partir de 1995 se vio que la incidencia aumentaba considerablemente. Este aumento se atribuye en parte al avance en las técnicas de diagnóstico, con especial mención a la tinción inmunohistoquímica de citoqueratina 20.

La tasa de incidencia anual estandarizada por millón de habitantes varía entre las distintas áreas geográficas siendo entre 2 y 4 en Europa y Estados Unidos (Agelli *et al.*, 2010). El país con mayor incidencia es Australia (8,2 por millón de habitantes), mientras que España, con 2.9 casos por millón de habitantes, se mantiene por debajo de la media europea (Tejera-Vaquerizo *et al.*, 2016).

La prevalencia del CCM varía entre los distintos grupos étnicos. El paciente típico es un hombre blanco entre 70 y 80 años con una historia de amplia exposición a la luz solar. Aunque se ha observado que también aparece en africanos, asiáticos, indios americanos e indonesios, el CCM es, aproximadamente, 25 veces más frecuente en caucásicos. Por otra parte, la incidencia del CCM es mayor en hombres que en mujeres en todos los grupos étnicos, con una relación de 2:1 para blancos y personas de piel oscura y una relación de 1.5:1 en el resto de grupos étnicos (Agelli *et al.*, 2010). Se han observado casos de CCM en gente joven, pero es extremadamente raro; la incidencia en adultos entre 35 y 39 años en Nueva Zelanda, por ejemplo, es de 0.03 por cada 100.000 habitantes mientras que para adultos mayores de 85 es de 17.56 (Robertson *et al.*, 2015).

Geográficamente, el CCM tiene una mayor incidencia en zonas con altos índices de radiación ultravioleta. La incidencia en la población caucásica está linealmente relacionada con el índice de radiación ultravioleta, siendo el estado de Hawái una de las zonas con mayor frecuencia de aparición de este carcinoma. (Agelli *et al.*, 2010)

1.1.2. Patogénesis

Histológicamente el CCM está formado por células pequeñas con tono azulado que se agrupan formando láminas o matrices trabeculares, expresando marcadores neuroendocrinos y con escaso citoplasma. El nombre CCM proviene de la similitud estructural e inmunohistoquímica que comparten las células tumorales con las células de Merkel. Estas células, descritas inicialmente por Friedrich Merkel en 1876, se localizan predominantemente en la lámina basal de la epidermis y en el epitelio folicular. Están relacionadas con el tacto suave, aunque también están involucradas en la síntesis de somatostatina entre otras funciones endocrinas y paracrinas (Feng *et al.*, 2008).

Cuando el patólogo Cyril Toker identificó por primera vez un tumor neuroendocrino trabecular en 1972, observó que tenía características similares con las células de Merkel (Toker, 1972). En los años posteriores los términos carcinoma neuroendocrino y trabecular se usaron para describir tumores de piel “granulados”. Con la llegada de la tinción de la citoqueratina 20 CCM se convirtió en el término más aceptado. La inmunohistoquímica ha sido la aproximación más usada para caracterizar este tumor, así como sus orígenes, siendo la citoqueratina 20 el primer marcador utilizado para un diagnóstico fiable de CCM.

Aunque tradicionalmente se ha asociado el CCM con las células de Merkel, recientes estudios sugieren que estas células podrían no ser el origen. En primer lugar, las células Merkel se encuentran en la lámina basal mientras que las células del CCM son dérmicas o subcuticulares

(Sibley *et al.*, 1985). En segundo lugar, aunque ambas células comparten ciertas características, hay grandes diferencias. Por ejemplo, la citoqueratina 20 está expresada en los dos tipos de células, pero su patrón de expresión difiere de manera significativa. En las células de Merkel se encuentra formando una red difusa por el citoplasma, mientras que en las células de CCM se organiza en agregados dando como resultado el típico patrón de tinción inmunohistoquímico (Moll *et al.*, 2005). En tercer lugar, las células tumorales del CCM expresan varios marcadores como c-kit, CD171 y CD24 que no se encuentran en las células de Merkel (Tilling y Moll, 2012). En cuarto lugar, las células de Merkel parecen estar terminalmente diferenciadas con un potencial proliferativo limitado y una baja tasa de reposición, además, tras su muerte, parecen ser reemplazadas por células madre epidérmicas pluripotenciales en lugar de por la división de otras células de Merkel (Van Keymeulen *et al.*, 2009). Por este motivo no hay evidencias de la proliferación de células de Merkel *in vivo*. Igualmente, otras células de la piel proliferan dando lugar a la aparición de tumores benignos como fibroblastos, fibromas; adipocitos, lipomas; melanocitos, nevus; queratinocitos, queratosis; mientras que no hay evidencia de tumores benignos de células de Merkel.

Los datos genómicos sugieren que los queratinocitos epidérmicos podrían ser el origen del CCM negativo para polyomavirus, debido al patrón de mutaciones ultravioleta característico de cánceres derivados de estas células (Goh *et al.*, 2015; González-Vela *et al.*, 2017). Por otro lado, recientes estudios virológicos señalan que fibroblastos localizados en la dermis podrían ser la diana del polyomavirus de células de Merkel y por tanto el origen de este cáncer (Liu *et al.*, 2016).

1.1.3. Carcinoma de células de Merkel y polyomavirus

Igual que en otros tumores cutáneos cancerosos, la patogénesis del CCM es una combinación entre factores genéticos, ambientales y moleculares. Uno de los mayores descubrimientos en este ámbito es el descubrimiento del polyomavirus de células de Merkel (PyVCM) en 2008, año en el que Moore y Chang identificaron un transcrito fusionado entre un antígeno T desconocido y una proteína tirosina fosfatasa humana en células del CCM, lo que llevó al análisis de la secuencia de 5387 pares de bases de dicho virus. El polyomavirus secuenciado estaba presente en el 80% de los tumores analizados y únicamente en el 8% de los tejidos control. La familia de los polyomavirus está dividida en tres grupos: (i) polyomavirus aviar, (ii) polyomavirus de mamíferos y (iii) polyomavirus relacionados con el virus de simio 40 (SV40). Los cuatro polyomavirus humanos pertenecen al subgrupo del SV40. En animales, la integración del DNA de este grupo viral en el genoma del huésped precede a la formación del tumor (Feng *et al.*, 2008).

El genoma del PyVCM está formado por regiones codificantes tempranas y tardías, ambas implicadas en el ciclo de replicación viral. La infección por polyomavirus típica se caracteriza por la expresión de antígenos tempranos, seguido de la expresión de las proteínas de la cápside. En tejido no tumoral PyVCM no se integra en el DNA humano, sino que se replica en el núcleo usando la maquinaria enzimática celular (Stakaitytė *et al.*, 2014). En condiciones normales el sistema inmune detiene la proliferación mediante la activación de la respuesta humoral y celular. De esta manera el virus se convierte en parte del microbioma de la piel y es eliminado en forma de virión encapsulado. Las radiaciones ultravioletas u otros agentes mutagénicos, envejecimiento, así como la inmunosupresión mediada por drogas o por infección

son capaces de reactivar el virus disminuyendo la vigilancia inmunológica. En la evolución del CCM el virus se integra en el genoma de manera no específica y expresa dos oncoproteínas, el antígeno grande T (LT) y el antígeno pequeño (ST). La truncación del antígeno LT, debido a una mutación, parece ser el factor determinante en el cambio del comportamiento del virus, pasando de replicarse y liberar viriones a la integración clonal y tumorigénesis. Esta truncación se puede producir tanto antes de integrarse al genoma, como después (apartado A de la figura 1). LT presenta varios dominios conservados entre los distintos polyomavirus, entre los que destacan el dominio de unión a la proteína del retinoblastoma (pRb) y la señal de localización nuclear. La unión de este antígeno a la proteína supresora de tumores altera la progresión del ciclo celular, contribuyendo a la desregulación de la proliferación. Esto es consecuencia de la incapacidad de la proteína Rb de reprimir el factor transcripcional E2F que activa a la ciclina E, cuando el antígeno LT se une a ella (apartado B de la figura 1) (Shuda *et al.*, 2008; Houben *et al.*, 2011; Spurgeon y Lambert, 2013)

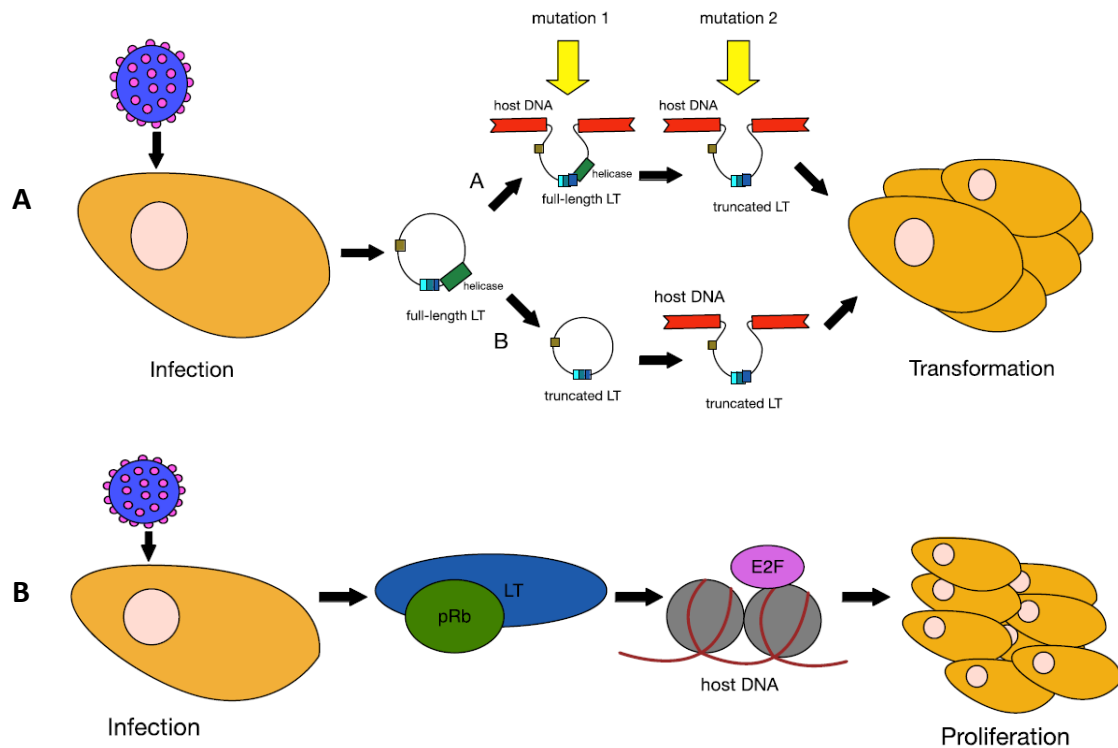


Figura 1. (A) Efecto del antígeno LT en la tumorigénesis del CCM. Se requiere, al menos, dos mutaciones: una que permita la integración en el genoma y otra que produzca la truncación necesaria. En el modelo A la truncación ocurre antes de la integración, en el modelo B sin embargo, ocurre después de la integración genómica. En ambos casos estos cambios en el virus llevan a la transformación y proliferación celular. (B) Efecto del antígeno LT en la proliferación celular. Durante la infección por PyVCM este antígeno interacciona con la proteína del retinoblastoma (pRb) inactivándola. Esto permite al factor E2F activar la transcripción de genes asociados a la progresión del ciclo celular. (Stakaitytė *et al.*, 2014)

El otro gran determinante de la oncogénesis es el antígeno ST, al cual se han asociado varias funciones oncogénicas. La primera de ellas está relacionada con la función de la proteína FBXW7, componente clave en el complejo ubiquitín ligasa SCF. En general, este complejo une ubiquitinas a proteínas diana, siendo esta la señal necesaria para su destrucción. La unión del antígeno ST a FBXW7 tiene como resultado la estabilización de las dianas del complejo SCF, entre las que se encuentran el antígeno LT, c-Myc y la ciclina E. Otra función crítica de ST es aumentar los niveles de 4E-BP1 fosforilado (y por tanto inactivo), factor de inicio de la traducción en eucariotas, lo que resulta en una amplia disregulación de la traducción. Además, este antígeno está involucrado en la expresión de genes implicados en la glicolisis, ruta clave para el rápido avance de las células del CCM (Becker *et al.*, 2017).

Para la detección de antígenos virales en el MCC se usa inmunohistoquímica ya que la expresión está limitada a las células tumorales (Shuda *et al.*, 2008). Por otro lado, ensayos serológicos más recientes que detectan las proteínas VP1 y VP2 por ELISA a partir de muestras de sangre han hecho el diagnóstico de PyVCM más sencillo (Viscidi *et al.*, 2011). Estos se basan en las diferencias que presenta la proteína de la cápside 1 del PyVCM y el resto de polyomavirus. Estos ensayos se han usado para determinar la incidencia de este virus en la población estudiando así su epidemiología. Se descubrió así que el PyVCM tiene una distribución mundial, demostrando que no solo la mayoría de pacientes con CCM son positivos para este virus, sino que el 50% de los menores de 15 años y el 80% de adultos están también infectados (seropositivos) (Tolstov *et al.*, 2009).

La mayoría de estudios coinciden en que los CCMs positivos en PyVCM muestran un mejor pronóstico a aquellos que no presentan el virus (Sihto *et al.*, 2011; Higaki-Mori *et al.*, 2012) tanto si se trata de una lesión primaria como si hay metástasis.

1.1.4. Tratamiento

El tratamiento para el CCM depende de la fase en la que se encuentre la enfermedad. La opción clásica es la eliminación quirúrgica del tumor con 2-3 centímetros de margen. Si hay evidencias de que el ganglio centinela puede estar afectado se lleva a cabo su eliminación y disección para determinar así el estadio del tumor. En la mayoría de casos se recomienda radioterapia adyuvante, pues se ha asociado a un menor riesgo de recaída (Jouary *et al.*, 2011). Si el tumor no se puede eliminar quirúrgicamente se utiliza únicamente radioterapia como medida paliativa. Por otro lado, históricamente, los pacientes con enfermedad sistémica han tenido pocas opciones eficaces. Aunque el CCM es sensible a diferentes agentes quimioterapéuticos como cisplatino, carboplatino, etopósidos, taxoles y antraciclinas, las respuestas no son duraderas (Schadendorf *et al.*, 2017; Becker *et al.*, 2017). Además, no se ha demostrado que aumente de manera considerable la esperanza de vida, siendo la media de supervivencia 21,5 meses (Tai *et al.*, 2000).

La abundancia de neoantígenos en CCM (tanto en forma de proteínas virales mediadas por la integración del PyVCM o en forma de gran cantidad de mutaciones UV en los CCM negativos para el virus) (Schadendorf *et al.*, 2017), la elevada susceptibilidad al desarrollo de CCM en individuos inmunosuprimidos así como la estrecha relación entre el infiltrado linfocitario y la supervivencia implican la susceptibilidad del CCM a la terapia de inhibición de puntos de control inmunitarios (ver apartado 1.3.) (Nghiem *et al.*, 2016).

1.2. Inmunología

El cáncer representa un ejemplo de proliferación clonal de células neoplásicas rodeadas de células no transformadas del estroma y de células inmunes implicadas en el crecimiento celular (Hanahan y Weinberg, 2000). El sistema inmune interacciona íntimamente con los tumores durante todo el desarrollo de la enfermedad, así como durante la progresión metastásica. Esta compleja relación entre las células inmunológicas y las células cancerígenas es capaz tanto de inhibir como de promover el crecimiento tumoral. Las consecuencias de estos infiltrados en el destino de las células cancerosas son diversas. Por ejemplo, bajo continua presión inmune, las células tumorales sufren un proceso denominado “inmunoedición” a través del cual pueden escapar la vigilancia inmunológica (Dunn *et al.*, 2004) e incluso modular las poblaciones de células inmunitarias para favorecer el crecimiento neoplásico. (Balkwill *et al.*, 2005). Sin embargo, recientes estudios han demostrado que la presencia de infiltrado linfocitario está relacionada con mejores respuestas a terapias, siendo una de las más importantes la terapia de bloqueo de punto de control inmunitario. (Topalian *et al.*, 2015).

Debido a su importancia, dos de los diez *hallmarks* descritos por Hanahan y Weimberg en 2011 están relacionados con el sistema inmune: habilidad para crear un ambiente de inflamación crónica y capacidad para evitar la destrucción inmunológica.

La producción de un ambiente inflamatorio es un proceso esencial en el desarrollo del cáncer en el que participan diferentes moléculas y células. Hasta hace poco, los esfuerzos se habían centrado en la hipótesis según la cual vías de inflamación extrínsecas favorecen o causan el desarrollo de cáncer. Sin embargo, hoy en día hay evidencias de que existe una vía inflamatoria intrínseca activada por eventos genéticos que provocan el desarrollo neoplásico. La activación de oncogenes como *myc* y *ras* o la inactivación de genes supresores de tumores como *pVHL* conduce a la producción constitutiva de citocinas inflamatorias por parte de las células alteradas. En algunos tipos de cáncer, el estado inflamatorio propicia el desarrollo de la enfermedad; en otros, los cambios oncogénicos son los que producen el estado inflamatorio que media la supervivencia de las células tumorales, promueve angiogénesis y metástasis, altera la actividad inmune innata y altera la respuesta a hormonas y agentes quimioterapéuticos (Balkwill y Coussens, 2004; Balkwill, 2005).

Por otro lado, los tumores también adquieren la capacidad de evitar el reconocimiento inmune. Los mecanismos de vigilancia inmunológica limitan el crecimiento del cáncer, pero no son completamente eficientes, por ello los tumores que acaban desarrollándose son aquellos poco o nada inmunogénicos (Dunn *et al.*, 2004). Una característica crítica que diferencia tumores subclínicos de un cáncer manifiesto es, por tanto, la susceptibilidad al control inmunitario que presenten. Debido a su importancia en el proceso de esta enfermedad, la capacidad de evitar esta vigilancia es otro de los *hallmarks* del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011). En los últimos años se ha descubierto que los tumores acaban desarrollando mecanismos para evitar ser susceptibles al reconocimiento inmunológico.

La creciente inestabilidad genómica de células que están sufriendo el proceso de transformación favorece la aparición de diferentes clones con distinta inmunogenicidad, de manera que los menos inmunogénicos son aquellos que acaban evitando la vigilancia inmunológica. Aunque no se entienden completamente, hay varios mecanismos por los cuales

las células tumorales escapan a la vigilancia inmunológica: pérdida de expresión de glicoproteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) confiriendo sigilo inmunológico; modificación y enmascaramiento de antígenos tumorales; inducción de tolerancia y expresión de inmunosupresores. (Adam *et al.*, 2003)

1.3. Inmunoterapia

Aunque el estudio de las células tumorales ha sido necesario en el establecimiento de terapias dirigidas, utilizar como diana las células del estroma y células del sistema inmune podría tener igual o mejor resultado.

A diferencia de la quimioterapia citotóxica y agentes dirigidos, que actúan sobre las propias células cancerígenas, la inmunoterapia estimula el control tumoral de manera indirecta mediante la inducción de la respuesta inmune antitumoral (Pardoll, 2012). La terapia dirigida guiada por perfil genómico puede tener mejor resultado que la quimioterapia, pero es común que se desarrolle resistencia (Carlino *et al.*, 2015). Además, menos del 10% de todos los pacientes presentan mutaciones para los cuales se haya aprobado este tipo de tratamiento (Dienstmann *et al.*, 2015).

El bloqueo de puntos de control inmunitarios puede desatar la actividad de los linfocitos T mediante la eliminación de señales inhibitorias que bloquean su función (Pardoll, 2012). Se ha demostrado que esta terapia produce una respuesta clínica duradera y aumenta la supervivencia en varios tipos de cáncer, muchos de los cuales eran de difícil tratamiento. (Topalian *et al.*, 2015). En la última década diversos estudios sugieren que el estado inmunitario está ligado al resultado clínico de pacientes con CCM, indicando que aumentar la inmunidad celular puede ser beneficioso. En este sentido, un estudio sobre el infiltrado linfocitario demostró que pacientes con una elevada cantidad de células CD8+ en el tumor tenían una mayor tasa de supervivencia con respecto a aquellos con poco o nada de infiltrado (Paulson *et al.*, 2011). La función de los linfocitos citotóxicos se regula mediante la proteína 4 asociada a linfocitos citotóxicos (CTLA-4), la proteína de muerte programada 1 (PD-1) y otras moléculas que mantienen el delicado equilibrio entre el final de la infección, la eliminación de células infectadas, el mantenimiento de la homeostasis tisular, y la prevención de las respuestas autoinmunes. CTLA-4 es un receptor de membrana expresado por las células T activas, que tiene similitud a la molécula coestimuladora de linfocitos T (CD28). Aunque tanto CD28 como CTLA-4 son ligandos de B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), cumplen diferentes funciones en la regulación de la actividad de linfocitos T. Mientras que CD28 aporta señales coestimuladoras necesarias para la activación de linfocitos T, CTLA-4 regula negativamente la respuesta de estas células. PD-1 se une al ligando de muerte programada-1 (PD-L1; también conocido como B7-H1 o CD274) expresado en células neoplásicas, varias células inmunitarias, células de soporte mesenquimal y células vasculares. Esta interacción regula negativamente la activación de linfocitos T cuando se acoplan a una célula PD-L1 positiva. De esta manera, la unión de PD-L1 a su receptor suprime la migración y proliferación de las células T y limita la eliminación de células cancerosas. (Topalian *et al.*, 2015).

La terapia de bloqueo de puntos de control inhibitorios que tiene como diana receptores de linfocitos T co-inhibitorios (principalmente PD-1 y CTLA-4) ha demostrado actividad clínica en varios tipos de cáncer (Topalian *et al.*, 2012). En cuanto al CCM hasta la fecha se han estudiado

3 anticuerpos (Nivolumab, Avelumab y Pembrolizumab) que tienen como diana el sistema PD-1–PD-L1, mostrando respuesta todos ellos. Aunque el número de pacientes estudiados no es muy elevado, se ha demostrado que esta terapia tiene una respuesta duradera (Nghiem *et al.*, 2016; Topalian *et al.*, 2017). Por otra parte, estudios de bloqueo de CTLA-4 se están llevando a cabo (ipilimumab).

Otras estrategias que se están estudiando para el tratamiento del CCM son: uso de IL-2 recombinante, ya que se ha visto que causa la regresión de tumores mediante la estimulación de la actividad de las células T en ciertos tipos de cáncer (Rosenberg *et al.*, 2008), con lo que se está estudiando su efecto en CCM ; utilización de CD56 como diana para terapia dirigida puesto que está expresada en prácticamente todos los CCM (Shah *et al.*, 2016); eliminación de la resistencia a quimioterapia (Kim y McNiff, 2008) y por último, tras el descubrimiento del PyVCM, se ha abierto la posibilidad de terapias dirigidas a antígenos virales, así como posibles vacunas (Zeng *et al.*, 2012)

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Partimos de las siguientes premisas:

- El CCM es un tumor neuroendocrino que puede llegar a ser muy agresivo.
- Si bien la primera opción terapéutica es la cirugía, en ocasiones esta no es posible o no garantiza un 100% de resecabilidad, y por tanto la curación de la enfermedad.
- Aproximadamente el 80% de los CCM presentan una infección por PyVCM como posible agente etiopatológico de esta enfermedad.

Así pues, nuestra **hipótesis** es la siguiente:

La respuesta inmune del CCM puede depender de muchos factores, especialmente de la infección de PyVCM. La definición de un perfil inmunológico diferencial en CCM puede identificar pacientes compatibles con el tratamiento basado en inhibición de puntos de control inmunitarios (inmunoterapia).

El **objetivo** del estudio es evaluar la expresión de distintos genes relacionados con el sistema inmune en CCM mediante la tecnología HTG EdgeSeq, estableciendo un perfil de expresión en cuatro condiciones:

- 1- Tumores positivos para el ligando de muerte programada (PD-1) frente a negativos para el mismo gen.
- 2- Tumores con presencia de linfocitos citotóxicos frente a tumores sin estas células.
- 3- Tumores con infiltración (mal delimitados) frente a tumores sin infiltración (delimitados).
- 4- Tumores positivos para el PyVCM frente a negativos para dicho virus.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Pacientes

Se han analizado un total de 48 tumores primarios, que pueden ser localizados o metastásicos de inicio. Sin embargo, 7 de ellos resultaron tener metástasis avanzadas y hubo que eliminarlos del análisis. Las principales características clinicohistopatológicas de los 41 tumores restantes que superaron los filtros para el análisis informático y en las que nos hemos basado para el análisis se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Características clinicohistopatológicas de las 41 muestras usadas en el análisis.

Parámetro clinicopatológico	n (%)
Tamaño tumoral	
< 2cm	15 (37%)
≥ 2cm	26 (63%)
Estadio de la enfermedad	
Localizados	27 (66%)
Metastásicos	14 (34%)
Infiltración	
Delimitado	20 (49%)
Mal delimitado	21 (51%)
PD-1	
Negativo	13 (32%)
Positivo	28 (68%)
CD8	
Negativo	32 (78%)
Positivo	9 (22%)
Polyomavirus	
Negativo	27 (66%)
Positivo	14 (34%)

3.1.2. Muestras de tejido parafinado

Para este estudio se utilizan secciones de 5 µm de tejido parafinado procedente de la biopsia tumoral de CCM. Tras la extirpación del tumor y su procesamiento en anatomía patológica se introduce el tejido en parafina, formando un bloque sólido. Posteriormente se realizan cortes, del grosor adecuado, en un micrótopo y se adhieren al portaobjetos. Adicionalmente se necesita otro corte contiguo teñido con hematoxilina-eosina, sobre el cual un especialista de anatomía patológica señala la zona con mayor cantidad de células tumorales. Este cristal sirve de guía para el raspado de la muestra en el portaobjetos sin tinción

3.1.3. HTG EdgeSeq

El sistema HTG EdgeSeq es una plataforma semiautomatizada de la empresa HTG molecular (Tucson, Arizona, EE. UU.) que permite la preparación de librerías sin necesidad de extracción. A partir de pequeñas cantidades de muestra se puede conseguir un perfil de expresión utilizando tecnologías de nueva secuenciación (NGS) (figura 2). Esta tecnología permite reducir la cantidad de muestra necesaria y disminuye los sesgos asociados a la extracción y manipulación del material permitiendo así un análisis rápido, fiable y reproducible.

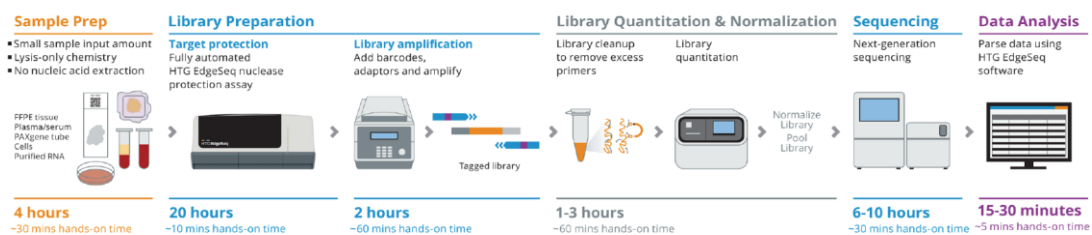


Figura 2. Flujo de trabajo en el sistema HTG EdgeSeq desde la extracción del material de la plataforma seleccionada hasta el análisis de datos

Existen diferentes tipos de paneles para uso en investigación, que analizan la expresión de distintos genes según sea la finalidad del ensayo. En este estudio se utilizó el panel Immuno-Oncology (IO) que permite la cuantificación de los niveles de expresión de 549 transcritos humanos involucrados en el proceso de respuesta inmune adaptativa e innata en el cáncer. Este ensayo posibilita el análisis y comprensión de infiltrados inmunitarios, evaluar la activación de la respuesta inmune y de los mecanismos reguladores, así como la investigación de puntos de control inmunitarios.

Los reactivos necesarios para este proceso son:

- Kit de preparación HTG, compuesto por:
 - Tampón de lisis
 - Proteinasa K
 - Aceite de desnaturalización
- Sistema de protección automático HTG:
 - Sondas de protección NPP (“nuclease protection probes”) del panel IO (“Immuno Oncology”) de HTG molecular.
 - Aceite de desnaturalización
 - Nucleasa S1.
 - Solución de parada S1.

- Placas de carga y parada proporcionadas por HTG.
- Procesador HTG.

3.1.4. Amplificación y Secuenciación

- Para la PCR se utilizó:
 - OneTaq®HotStart 2X Master Mix GC buffer de la casa New England Biolabs
 - Agua de calidad (libre de contaminación DNAsa, RNasa y proteasa)
 - Combinación de 12 primer forward y 8 reverse proporcionados por HTG molecular
- Para la limpieza de la librería se usó el sistema de bolas magnéticas Agencourt AMPure XP de la compañía Beckman coulter (Brea, California, EE.UU.) además, los siguientes reactivos fueron necesarios:
 - Tampón TE (Tris-HCl pH 8.0, EDTA)
 - Etanol 80%
- Cuantificación (qPCR):
 - Tampón TE (Tris-HCl pH 8.0, EDTA) + tween 20
 - Kit KK4824 de la casa KapaBiosystems (Wilmington, Massachusetts, EE.UU)
- Secuenciación MiSeq de Illumina (San Diego, California, EE.UU.):
 - Tampón TE (Tris-HCl pH 8.0, EDTA)
 - Kit de reactivos Illumina para MiSeq
 - Control PhiX Illumina
 - 2.0 N NaOH, H₂O, 2.0 N HCl.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparación de la muestra.

Se parte de secciones de tejido parafinado colocadas sobre un portaobjetos. Para poder realizar el protocolo es necesario que el tejido parafinado o FFPE ("Formalin-fixed Paraffin-embedded") contenga un área mínima de 12.5 mm² de tejido tumoral con un porcentaje mayor o igual a un 80% de células tumorales. Utilizando el corte contiguo teñido con hematoxilina-eosina se determina el área de la sección a utilizar, marcada por el patólogo como la zona de mayor cantidad de tejido tumoral. A continuación, se utiliza un bisturí para rascar la zona, recogiendo el tejido parafinado y colocándolo en un Eppendorf. En este paso es importante evitar rascar parafina pues interferiría con el análisis. Tras esto, se determina el área total de tejido raspado y se calcula la cantidad de tampón de lisis necesario a razón de 35 µL por cada 12,5 mm², añadiéndolo al tubo y mezclando en un vortex. El siguiente paso consiste en añadir 500 µl de aceite para evitar evaporación y dejar incubar durante 15-20 minutos a 95 °C, permitiendo la liberación del RNA. A continuación, se deja enfriar a temperatura ambiente y se añade la proteinasa K a la fase acuosa a una relación 1/20 con el tampón de lisis. Las muestras se incuban durante 3 horas en agitación a 50 °C dejando actuar el enzima, que degrada proteínas que puedan interferir en el análisis. Una vez terminada la incubación se pipetea un volumen de 35 µL de cada lisado a los pocillos de la placa de muestras HTG.

3.2.2. Preparación de la librería.

Para la preparación de la librería se introduce la placa de muestras, junto con el paquete de reactivos, la placa de parada y una caja de puntas de pipeta de 165 μ L proporcionados por la empresa HTG molecular en el procesador HTG EdgeSeq.

Durante esta etapa completamente automática, de aproximadamente 20 horas de duración, se sustituyen los RNAs mensajeros por sondas sintéticas. En primer lugar, el procesador añade el aceite de desnaturalización que protege a las muestras de la evaporación para, acto seguido, incorporar las sondas de protección del panel IO. Cada sonda es específica de un transcrito y está flanqueada por dos secuencias de protección (“Wings”). El siguiente paso consiste en aumentar la temperatura para eliminar las hibridaciones inespecíficas, permitiendo después la correcta unión de las diferentes sondas a su RNA diana junto a dos moléculas complementarias a la secuencia *Wing* (“Wingman”). El resultado es un heterodímero representado en el apartado A de la figura 3. A continuación, el sistema añade la nucleasa S1 (degradación de hebra simple) para la eliminación de las sondas no hibridadas y del RNA sobrante, resultando en una relación estequiométrica 1:1 entre las sondas y RNA diana (apartado B de la figura 3).

Tras el paso de inactivación de la nucleasa con la solución de parada se transfiere el resultado a la placa de parada. A continuación, el sistema aplica calor lo que, sumado al pH alcalino de la solución, permite la separación del heterodímero y eliminación del RNA quedando únicamente la sonda sintética protegida (apartado C de la figura 3). Una vez terminado este proceso, se enfría y se da por concluida la reacción. Las sondas sintéticas tienen mucha más estabilidad que el RNA mensajero, por lo que se evitará pérdidas de material, así como degradación en pasos posteriores.

Tras esto, se añaden adaptadores de secuenciación y se etiqueta cada muestra mediante una reacción de PCR (apartado D de la figura 3). Para hacerlo en una placa de 96 pocillos se combinan 12 tipos de *primers forward* (1-12) con 8 *reverse* (A-H) marcando de manera única todas las muestras. Los *primers* están formados por un adaptador de secuenciación, una secuencia específica que permitirá la distinción de las muestras (código de barras), así como el fragmento complementario a la secuencia *Wing*, que sirve como inicio de la reacción. En primer lugar, se prepara el mix de reacción, para lo cual se pipetea 150 μ L de OneTaq® HotStart 2X Master Mix sumado a 60 μ L de H₂O y 30 μ L de *primer forward*. Dado que hay 12 *primers forward* se obtendrá un máximo de 12 mix de reacción. A continuación, se añaden 24 μ L de este preparado junto a 3 μ L de muestra a la placa de reacción de PCR (columnas 1-12). El último paso es añadir 3 μ L de los 8 tipos de *primer reverse* (filas A-H) creando una combinación única en cada pocillo (ver tabla A1 del anexo). En caso de no necesitar las 96 muestras de la placa, se eliminan filas de *primers reverse* según se necesite. El termociclador usado fue Veriti 96-Well Thermal Cycler de Applied Biosystems (Foster City, California, EE.UU.). El programa utilizado se muestra en la tabla 2. Dado que no todas las muestras se recibieron al mismo tiempo, se prepararon 3 librerías distintas de 24 muestras donde estaban incluidas las 48 muestras de este estudio (ver tablas A2, A3 y A4 del anexo).

Tabla 2. Reactivos y fases del ciclo de PCR.

Reactivos	DI ¹	20 CICLOS			EF ⁵
		D ²	H ³	E ⁴	
OneTaq® HotStart + Primers + H ₂ O.	95°C (4 min)	95°C (15 s)	56°C (45 s)	68°C (45 s)	68°C (10 min)

¹Desnaturalización inicial; ²Desnaturalización; ³Hibridación; ⁴Elongación; ⁵Elongación final.

El resultado de la reacción se puede ver en el último apartado de la figura 3. Para recuperar las muestras se retira la placa de parada del procesador HTG.

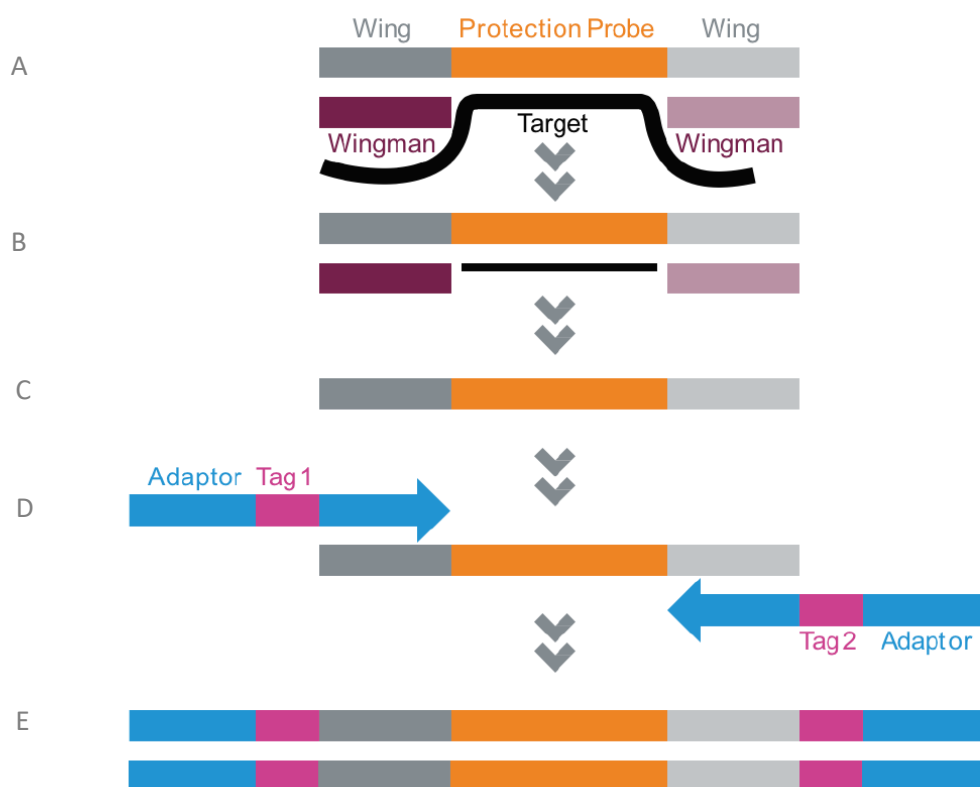


Figura 3. Proceso de formación de la sonda sintética: hibridación del RNA mensajero y la sonda de protección (A); eliminación de las sondas no hibridadas y del mensajero sobrante (B); selección de las sondas sintéticas eliminando el mensajero (C); PCR añadiendo los adaptadores de secuenciación y el código de barras (D); sonda sintética terminada (E).

El siguiente paso es eliminar cualquier resto no deseado, especialmente los *primers* de la amplificación. Para ello se usa el sistema de bolas magnéticas Agencourt AMPure XP. En primer lugar, se transfiere 15 µL de cada producto de PCR a una nueva placa de 96 pocillos añadiendo a continuación, 37.5 µL de la solución AMPure XP a cada pocillo. Esta solución

contiene bolas paramagnéticas (magnetismo solo en presencia de un campo magnético) hechas de poliestireno rodeadas por una capa de magnetita y cubierta por radicales carboxilo. Además, contiene polietilenglicol (PEG) al 20% y sal (NaCl) a una concentración de 2.5M que actúan como agentes precipitantes. La inmovilización del DNA depende de la concentración de sal y PEG presente, por lo que la relación volumétrica entre la solución AMPure y el DNA es crítica. Una vez añadido se mezcla hasta obtener una solución homogénea y se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos en un agitador a 1800 revoluciones por minuto. Acto seguido, se coloca la placa en un soporte de imanes dejando reposar por 3 minutos. Transcurrido este tiempo, se forma un pellet en las paredes de cada pocillo compuesto por las bolas magnéticas unidas al DNA a purificar. A continuación, se elimina el sobrenadante con especial cuidado de no alterar el pellet formado. El siguiente paso consiste en realizar tres lavados con etanol al 80%, pipeteando 200 μ L en cada pocillo y dejando reposar por 1 minuto y eliminando el sobrenadante. Concluidos los lavados, se deja secar la placa por un total de 5 minutos a temperatura ambiente.

Una vez eliminado el material no deseado se procede a resuspender las bolas magnéticas y liberar las sondas unidas, para lo cual se añade 40 μ L de tampón TE a cada pocillo, mezclando con la pipeta. A continuación, se introduce la placa en un agitador a 1800 revoluciones por minuto. Acto seguido se vuelve a colocar la placa sobre el imán y una vez las bolas se han adherido a la pared del pocillo, se recoge 30 μ L de sobrenadante a una placa nueva quedando la librería terminada.

3.2.3. Cuantificación y Normalización

Una vez terminada la librería se procede a cuantificar las muestras para la posterior normalización. En este caso se utilizó el kit 4824 de la casa Kapa, específico para plataformas de Illumina. Este kit cuenta con: 6 estándares de DNA (desde 20 pM a 0.0002 pM) que permite el cálculo de la concentración de las diferentes muestras; Mix de primers específicos para index de Illumina (secuencias P5 y P7 del cartucho de secuenciación); KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix que, además de los reactivos necesarios para la PCR, contiene la molécula de fluorescencia SYBR Green que permite medir la fluorescencia en cada ciclo de qPCR y, por último, el reactivo ROX. La molécula fluorescente ROX permite tener una referencia interna a partir de la cual se puede normalizar la señal de la molécula reportera SYBR Green tras la finalización de la qPCR para corregir alteraciones en la fluorescencia debidas a variaciones en el volumen o concentración de las muestras.

En primer lugar, se realiza una dilución 1:100 de la librería, para lo cual se diluyen 3 μ L de cada muestra con 297 μ L de tampón TE (Tris-HCl pH 8.0, EDTA) + tween 20. A continuación, se realiza una segunda dilución 1:100 igual a la anterior, resultando en un factor de dilución total de 1:10000.

Una vez diluidas las muestras se preparan los tubos de PCR. Para ello se añaden 10 μ L de KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix, 2 μ L del mix de *primers* específicos de Illumina y 0,4 μ L de la molécula fluorescente Rox low. A la solución de 16 μ L se le añade 4 μ L de muestra procedente de la dilución anterior. Para la reacción de cuantificación se utilizaron también 6 estándares de DNA, con 3 réplicas de cada uno, que sirvieron para saber la concentración de las muestras, así como 3 réplicas de blanco (4 μ L de H₂O en lugar de muestra). El termociclador

utilizado es el 7500 Fast Real-Time PCR System de Applied Biosystems, el programa seguido se refleja en la tabla 3.

Tabla 3. Fases y ciclo de la PCR cuantitativa.

Pasos	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	30 sec	35
Hibridación/Extensión/ Medida de fluorescencia	60°C	45 sec	

La reacción dura 50 minutos, tras esto, el software del propio termociclador obtiene los valores del ciclo de reacción en los cuales los estándares superan el punto de corte de fluorescencia determinado (valor CT) y los representa frente a su concentración. Con esto se consigue una recta patrón sobre la cual se extrapolará el ciclo en el que las muestras superan dicho valor de corte obteniéndose así la concentración de cada muestra.

A continuación, la hoja Excel obtenida del termociclador se introduce en el programa de cálculo de librerías de HTG EdgeSeq. Con este software, sabiendo la concentración de las muestras, se calcula el volumen que es necesario pipetear de cada una para, tras juntarlas en un único tubo ("pool"), obtener una distribución de concentraciones normalizada que no produzca sesgos en la secuenciación. Por motivos de optimización de las carreras del secuenciador, se prepararon 4 *pools* donde se encontraban las 48 muestras de este estudio junto a otras muestras distintas.

3.2.4. Secuenciación

En toda reacción de secuenciación es necesario preparar un control de DNA para verificar el resultado. Para ello, se descongela PhiX 10 nM del kit de reactivos de Illumina y se diluye a 4 nM combinando 2 µL de la solución al anterior con 3 µL de TE (Tris-HCl pH 8.0, EDTA). A continuación, se prepara una disolución 0.2 N de NaOH mediante dilución de 2.0 N NaOH con H₂O. El siguiente paso es combinar 5 µL de cada reactivo en un tubo nuevo agitando en un vortex y centrifugando a 280 xg durante 1 minuto. Acto seguido, se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos con el objetivo de conseguir una completa desnaturalización de la librería. El siguiente paso consiste en añadir 5 µL de TE, repitiendo el agitado en vortex y el centrifugado. Por último, se incorporan 985 µL del tampón HT1 del kit de reactivos de Illumina volviendo a agitar y centrifugar. El resultado es un control de DNA con una concentración de 20 pM.

Para la desnaturalización de la librería se añade 2.0 N NaOH en función del volumen total, según las especificaciones de Illumina, mezclando con vortex y centrifugando 1 minuto a 280 xg. Se mantiene a temperatura ambiente durante 8 minutos para la correcta desnaturalización de la librería. Acto seguido se añade el tampón HT1 al tubo y por último se pipetea el mismo volumen de 2.0 N HCl que el añadido de NaOH.

Una vez preparada la librería se añadirán 24 μL del control desnaturalizado PhiX. El volumen tras este paso es de 600 μL , por lo que el porcentaje de control en la muestra es del 4%, parámetro importante a la hora de verificar si la secuenciación ha sido correcta. Una vez la solución de secuenciación está completa, se realiza un paso de desnaturalización térmica 4 minutos a 98°C, enfriando de manera inmediata en hielo durante 5 minutos. Tras esto se cargan los 600 μL de librería desnaturalizada al cartucho de secuenciación y se introducen en el secuenciador MiSeq.

Para este tipo de análisis se necesita un mínimo de 500000 lecturas por cada muestra. En total fueron necesarias 4 carreras en el secuenciador, la primera se hizo con 24 muestras y las siguientes tres con 16 para aumentar el número de lecturas dedicadas a cada muestra.

3.2.5. Análisis Informático

Del secuenciador se obtienen archivos FASTQ que se introducen, de nuevo, en el software de HTG. Aquí, mediante un algoritmo de agrupamiento, se transforman los datos obtenidos del secuenciador en una hoja Excel donde se refleja el número de lecturas de cada gen en todas las muestras.

A continuación, estos datos son analizados utilizando RStudio, entorno de desarrollo integrado para el lenguaje de programación R dedicado a la computación estadística y gráficos. Cabe destacar que, debido a la elevada heterogeneidad de las muestras, hubo que eliminar varias, por lo que se procedió al análisis con 41.

Para cada condición estudiada se aplican técnicas de visualización como son el análisis de componentes principales (PCA) y algoritmos de agrupamiento. Tras esto se calcula la relación de expresión en cada gen entre positivos y negativos ("fold change"), así como el p-valor y p-valor ajustado para confirmar la significación estadística mediante el test de Wald.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La normalización de las muestras a la hora de preparar el *pool* es un paso fundamental para evitar sesgos relacionados con el uso de concentraciones diferentes de cada muestra. Por ello es necesario realizar la qPCR como se ha descrito en el apartado 3.2.3. Dado que se hicieron cuatro *pools* fue necesario realizar el mismo número de reacciones de qPCR. El resultado de una de ellas fue el mostrado en la figura 4.

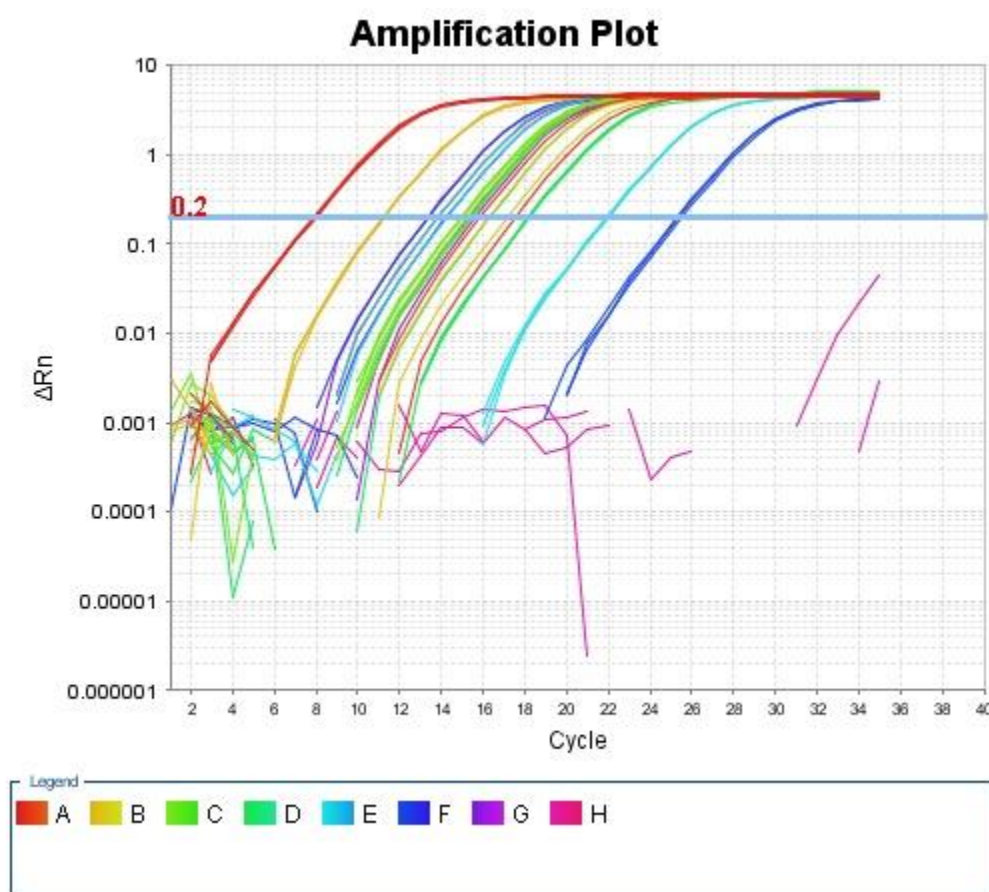


Figura 4. Representación de la amplificación que tiene lugar en la qPCR. Los colores A-H indican las soluciones de concentración conocida que se usan para la recta de calibrado.

Una vez conocidas las concentraciones es necesario calcular qué cantidad de cada muestra es necesario pipetear para tener una representatividad homogénea. Los datos aparecen en las tablas A5, A6, A7 y A8 del anexo.

Tras la preparación de los 4 *pools* se procedió a la secuenciación. El número total de lecturas por muestra aparecen reflejados en la figura 5. Pese a la normalización llevada a cabo en la formación del *pool* se observan claras diferencias en el número de lecturas entre las distintas muestras en las diferentes carreras. Entre las posibles razones para este hecho encontramos la calidad de la librería, determinada a su vez por la calidad de la muestra y el sesgo experimental que se puede producir durante la preparación de la misma (errores de pipeteo, por ejemplo).

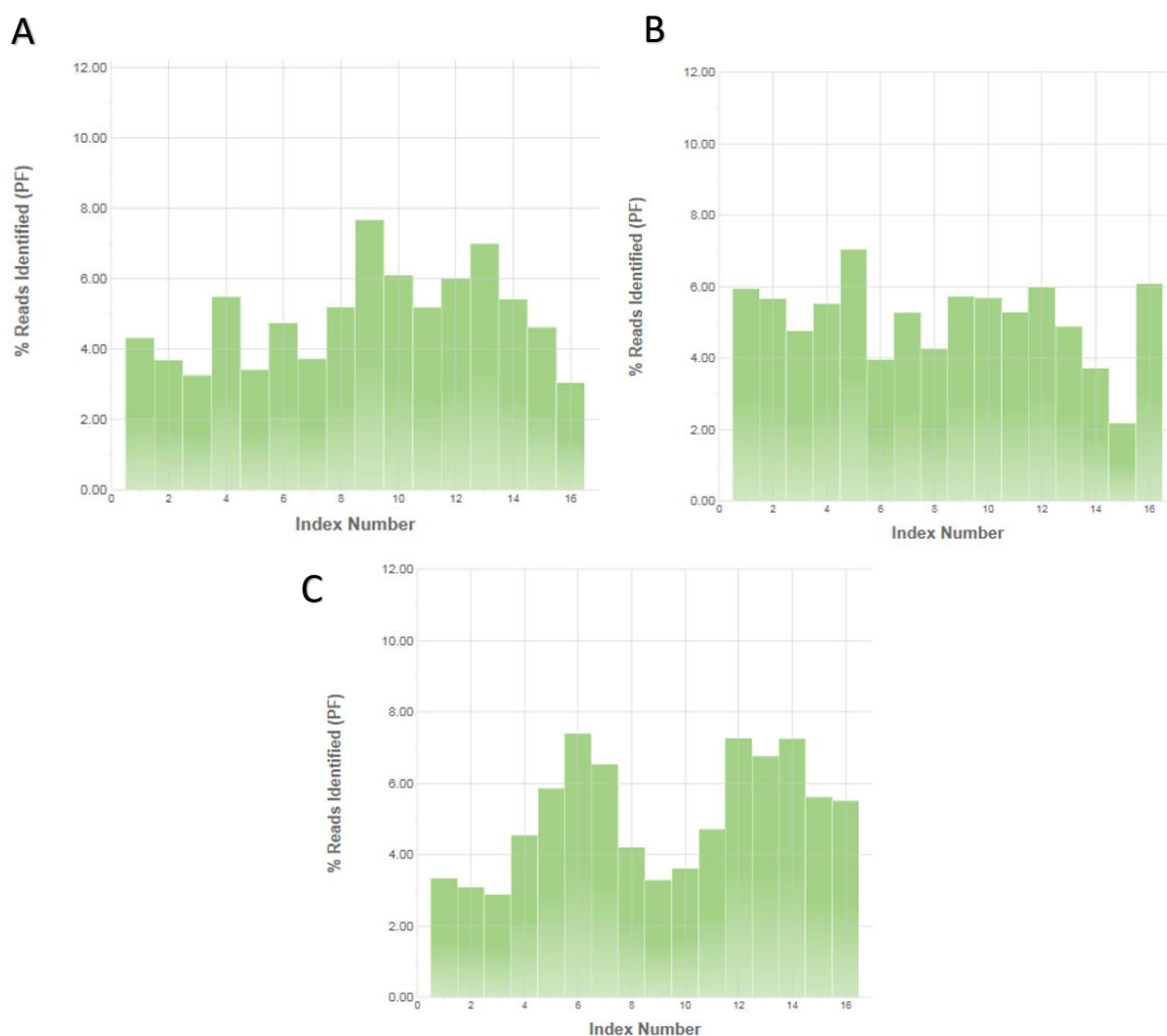


Figura 5. Gráficas A-C: número de lecturas por muestra en la secuenciación. Nótese la falta de una carrera, debido a problemas en el software de Illumina.

Otro de los parámetros más importantes a tener en cuenta en una secuenciación es la calidad obtenida. Este parámetro refleja la probabilidad de que el nucleótido secuenciado sea erróneo. Los datos aparecen reflejados en la escala Phred, donde un valor de 30 indica que la probabilidad de error es de 1 en 1000 bases. A partir de dicho valor, se considera que la secuenciación es válida. Tras cada carrera del secuenciador, se obtienen los gráficos reflejados en la figura 6, que indican la calidad obtenida en los distintos clústeres. En todas ellas, se observa que la calidad obtenida en la mayoría de clústeres es superior a 30, con lo que se acepta que la secuenciación ha sido un éxito.

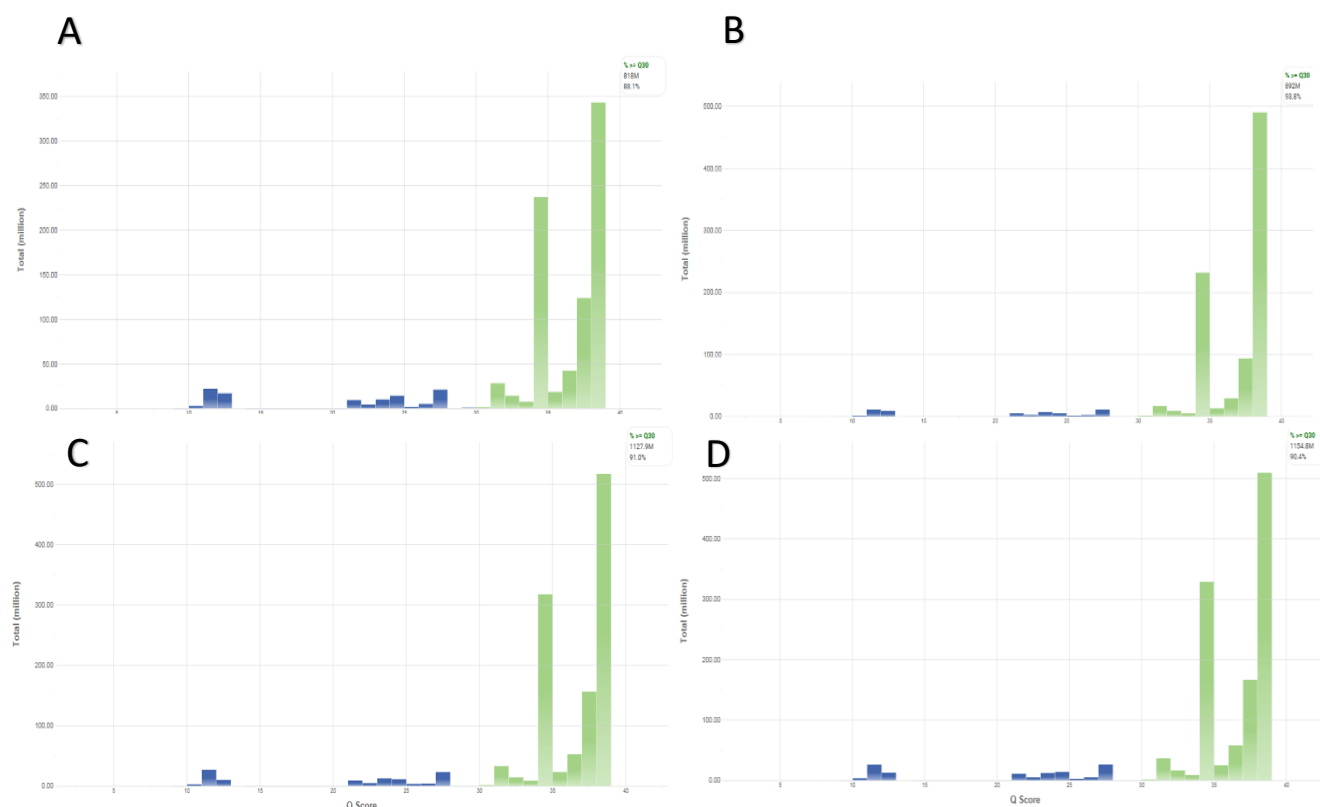


Figura 6. Gráficas A-D: Calidad estimada para los clústeres en las distintas carreras de secuenciación. El porcentaje con calidad superior a 30 son del 88.1 (A), 93.8 (B), 91.0 (C) y 90.4 (D).

El objetivo de la secuenciación era identificar las sondas y el número en el que se encontraban, por ello se leyó únicamente por un extremo (“single end”). Tras esto, se obtuvieron los archivos formato FASTQ que se alinearon con el programa HTG EdgeSeq Parser Setup. Tras este paso, se obtuvo un archivo tipo Excel donde aparecía el número de copias de los genes analizados para todas las muestras. Este archivo es la base del análisis de expresión.

El primer paso fue normalizar ya que para técnicas como el PCA se requiere que las variables tengan igual participación en el cálculo de las componentes principales.

4.1. PD-1

La primera condición a estudiar es la presencia de la proteína PD-1. Con técnicas inmunohistoquímicas (anticuerpo anti PD-1) se evaluó si estaba presente en el tejido tumoral clasificando las muestras en positivas y negativas. A continuación, se plasmaron los resultados en el PCA (figura 7). Como se puede observar, no hay una separación clara entre los dos grupos a distinguir, tampoco eliminando los valores más irregulares (apartado B de la figura 7).

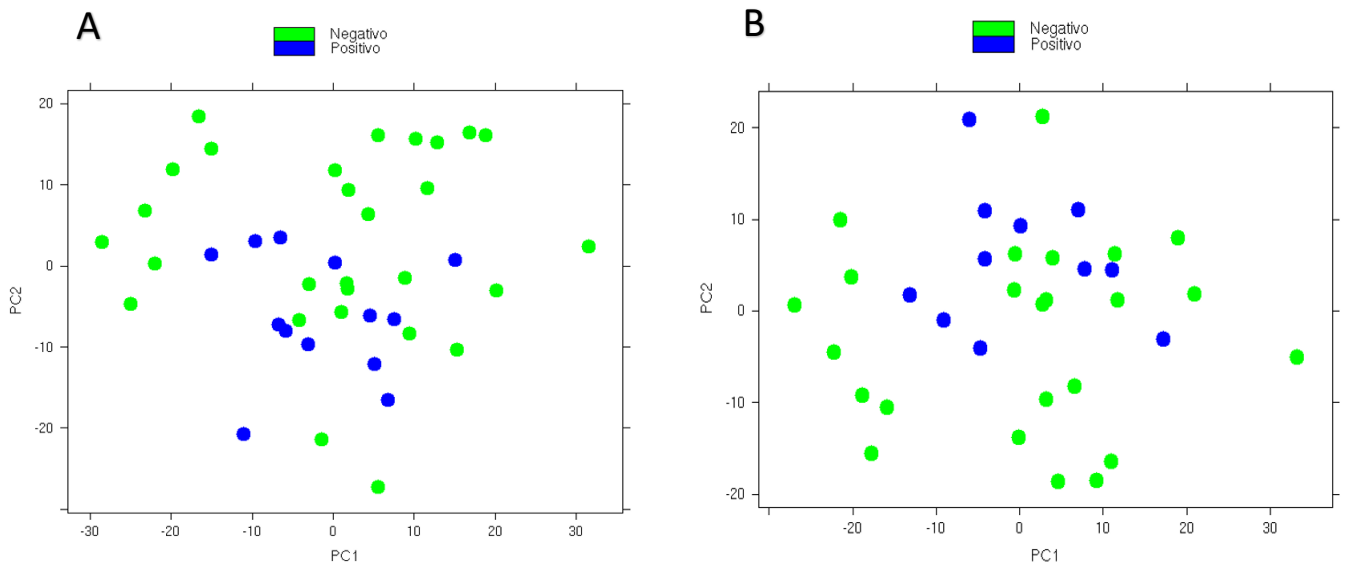
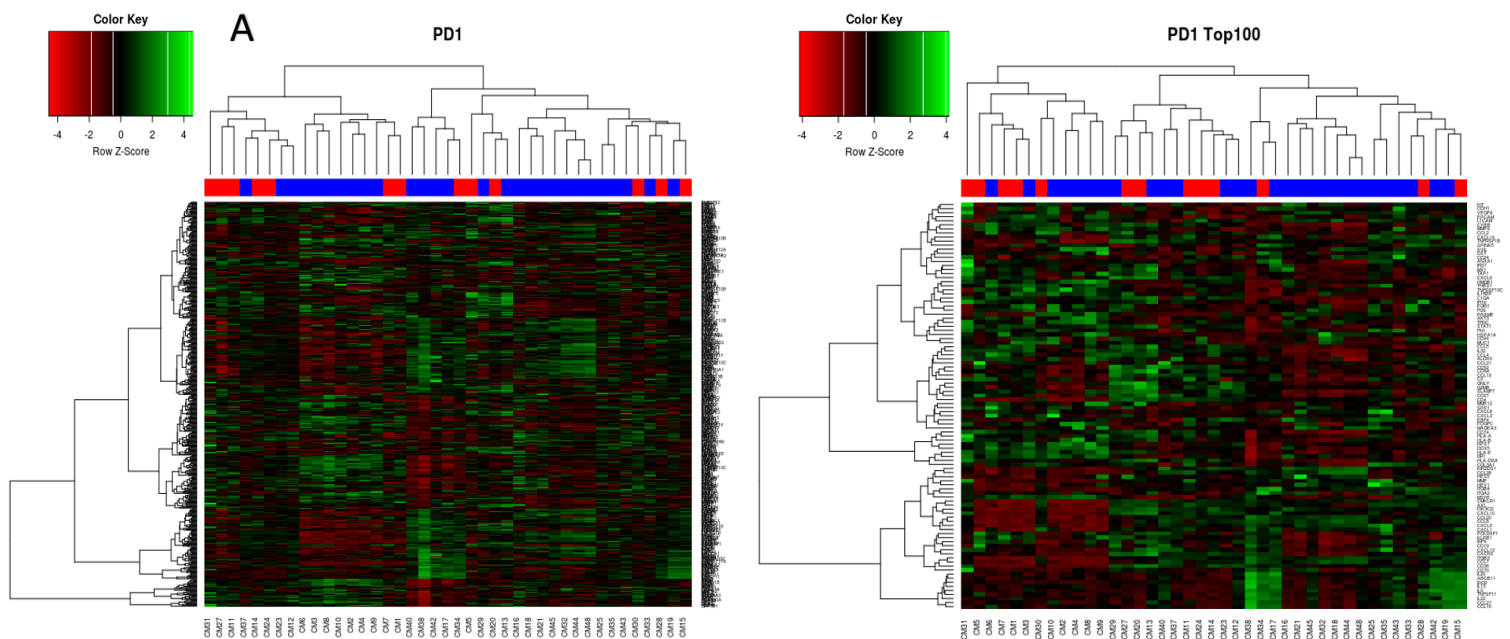


Figura 7. Diagrama del análisis de componentes principales donde se ha plasmado si los casos son negativos (verde) o positivos (azul) para la proteína PD-1. A la izquierda las 41 muestras (A) y a la derecha sin los valores más atípicos (B).

El siguiente paso consistió en aplicar un algoritmo de agrupamiento para visualizar la relación entre los patrones de expresión de cada muestra y observar si se agrupan en función de la presencia de PD-1 (figura 8). Como se puede apreciar, en el primer apartado de la figura 8 no hay un agrupamiento definitorio de las muestras considerando los 549 genes del análisis ni tampoco considerando únicamente los 100 genes con expresión más desigual. Tampoco se identifica separación de las muestras en las dos clases esperadas (PD-1 positivos y PD-1 negativos) cuando se eliminan del análisis las muestras con valores más atípicos (apartado B de la figura 8).



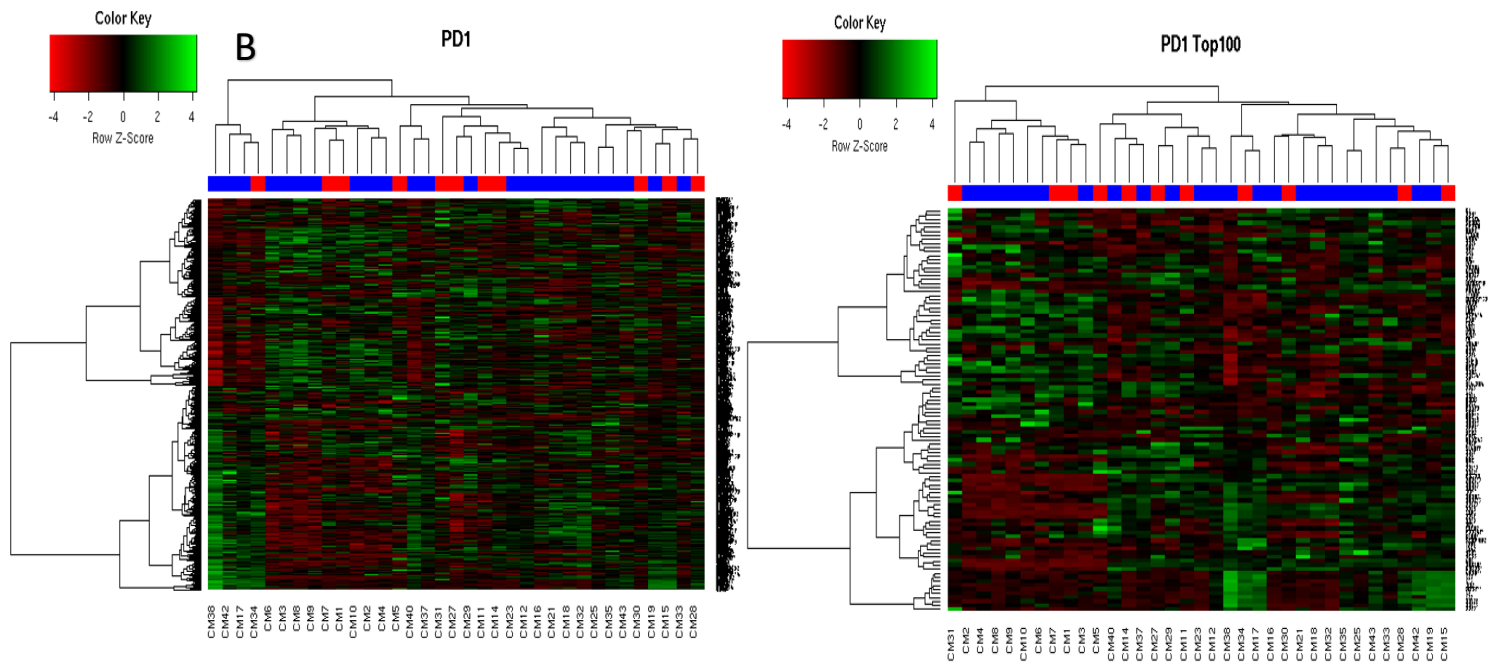


Figura 8. Agrupamiento de las 41 muestras en función de su patrón de expresión (A), agrupamiento eliminando los valores irregulares (B). La barra horizontal al comienzo indica la condición PD-1 (rojo para positivos y azul para negativos). Los valores de expresión están indicados en una escala de color donde negro sería en la media de todos los genes, rojo infraexpresado, y verde sobreexpresado.

Pese a no haber podido identificar nuevas clases entre las muestras biológicas quisimos hacer un test de hipótesis para saber, con robustez estadística, si había genes que estuvieran diferencialmente expresados entre las muestras que son positivas para la proteína PD-1 frente a las que no se encontró presencia de esta molécula. Para ello se utilizó el test de Wald, el resultado se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Valor de expresión (*baseMean*), logaritmo en base 2 del *fold change*, p-valor y p-valor ajustado para genes diferencialmente expresados en el análisis con todas las muestras (A) y sin valores atípicos (B).

A Test de Wald: PD1 Positivo vs Negativo				
	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>
MAGEA3	1389.11	-2.822846	1.259799e-06	0.0006916298
B Test de Wald: PD1 Positivo vs Negativo (sin valores atípicos)				
	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>
HLA-DRA	8479.1957	1.2026042	0.0002888521	0.02358864
IFI16	1808.2131	1.1036761	0.0012114288	0.05933375
CD74	26601.1411	0.9819912	0.0049078279	0.09953165
CIITA	892.6312	0.9256672	0.0041325784	0.09596765
TNFSF10	824.1480	0.8441359	0.0017897939	0.05933375
HEYL	566.9582	-0.8772262	0.0052385080	0.09953165

El gen con mayor diferencia entre las dos clases fue HLA-DRA (OMIM#142860) con un valor logarítmico de *fold-change* de 1.20. Este parámetro refleja cuánto cambia una variable entre una condición inicial a una condición final, en este caso la expresión del gen. El valor obtenido indica que el gen está más de dos veces sobreexpresado en muestras PD-1 positivo frente a las negativas para este gen. El p-valor ajustado también está por debajo del máximo establecido, por lo que el nivel de expresión parece ser significativamente distinto entre las dos clases. Este gen es uno de los 3 grandes isotipos de la clase 2 del complejo mayor de histocompatibilidad. Su función es presentar antígenos a linfocitos T CD4+, participando así en el desarrollo de la respuesta inmune.

Por otra parte, los genes CD74 (OMIM# 142790) y CIITA (OMIM# 600005) implicados en el transporte del complejo mayor de histocompatibilidad a la membrana plasmática y en la expresión de las proteínas que lo forman respectivamente, también se encontraban más expresados en tumores con PD-1 presente (aproximadamente el doble).

PD-1 está expresado en linfocitos T y B (Agata *et al.*, 1996) por lo que se puede afirmar que estas células están presentes en tumores positivos para PD-1. De este modo cabría esperar que el gen HLA-DRA junto con CD74 y CIITA también estuvieran expresados, ya que participan en el proceso de presentación antigénica, teoría que se confirmó en este estudio.

4.2. CD8

La segunda condición que se estudió fue la presencia de linfocitos citotóxicos en el microambiente tumoral. Esto se evaluó mediante inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo marcado que tiene como diana la proteína CD8. A partir de esto se clasificaron las muestras en positivas y negativas, aplicando los resultados en el análisis de componentes principales (figura 9). Como se puede observar, no hay separación entre las dos clases (CD8+ y CD8-) al considerar todas las muestras ni tampoco al eliminar del análisis los valores irregulares.

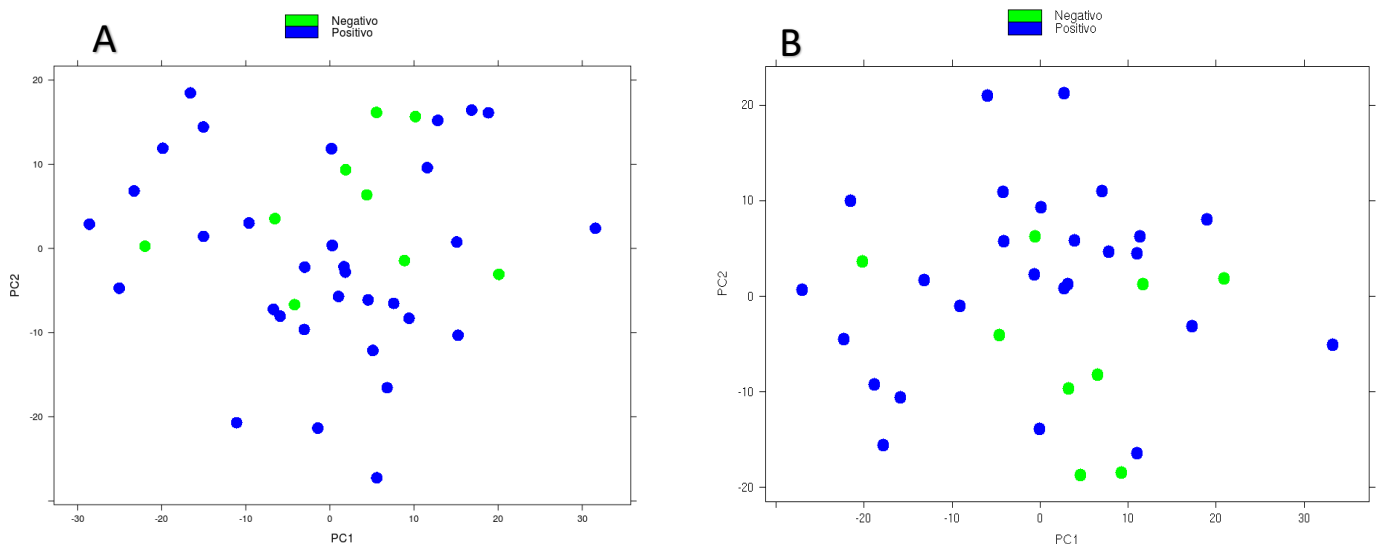


Figura 9. Diagrama del análisis de componentes principales donde se ha plasmado si los casos son negativos (verde) o positivos (azul) para la proteína CD8. A la izquierda las 41 muestras (A) y a la derecha sin los valores más atípicos (B).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, procedimos a visualizar si existían similitudes en los patrones de expresión de las distintas muestras. Para ello se aplicó, de nuevo, el algoritmo de agrupamiento. El resultado se muestra en la figura 10. Como se puede apreciar no hay una agrupación clara de las muestras al utilizar todos los datos (apartado A) ni tampoco al eliminar del análisis las muestras más irregulares (apartado B).

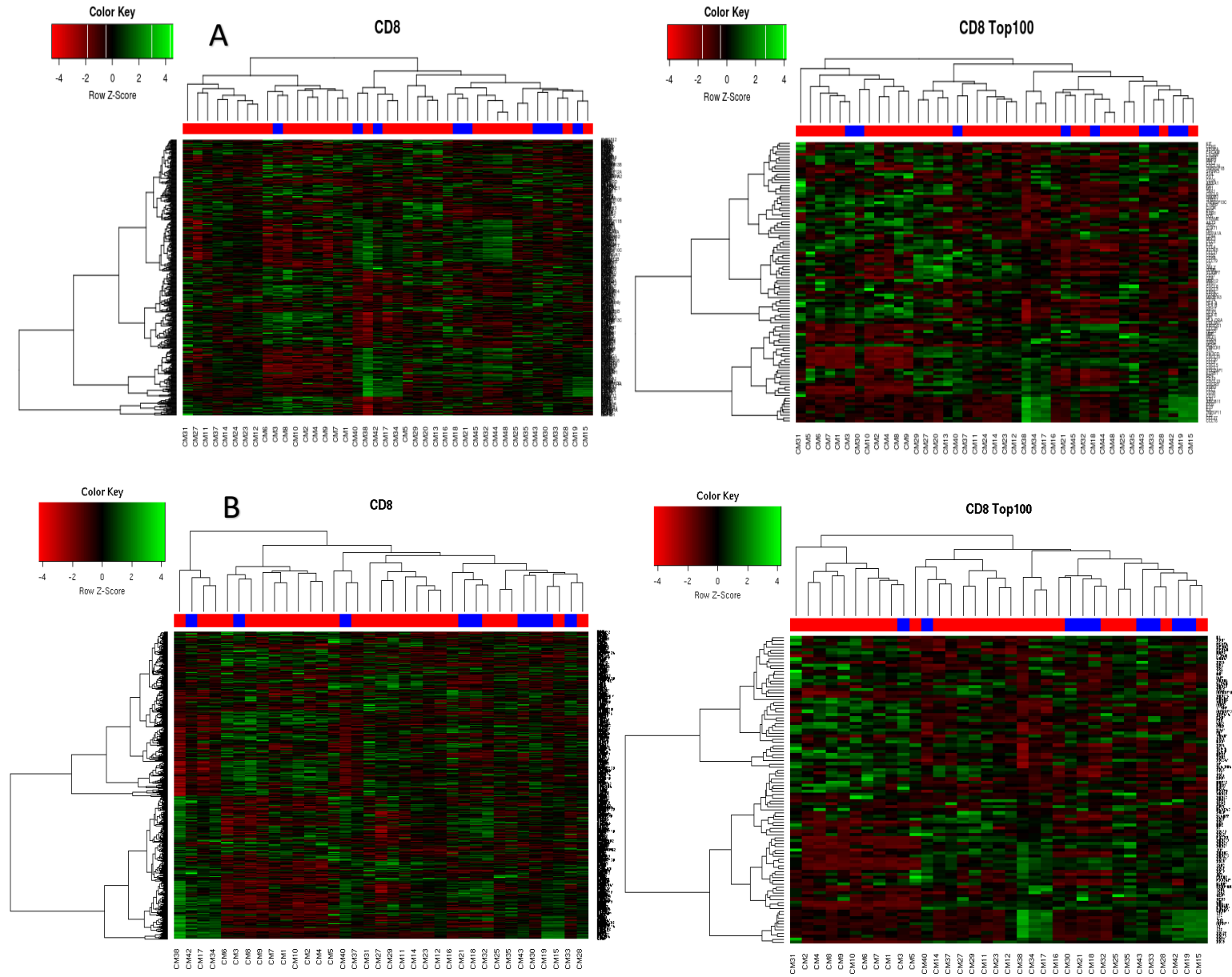


Figura 10. Agrupamiento de las 41 muestras en función de su patrón de expresión (A), agrupamiento eliminando los valores atípicos (B). La barra horizontal al comienzo indica la condición CD8 (rojo para positivos y azul para negativos). Los valores de expresión están indicados en una escala de color donde negro sería en la media de expresión, rojo infraexpresado, y verde sobreexpresado.

Igualmente, llevamos a cabo un análisis de hipótesis para conocer, con significación estadística, si existían genes diferencialmente expresados entre las dos clases. Para ello se aplicó el test de Wald. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. valor de expresión (*baseMean*), logaritmo en base 2 del *fold change*, valor p y valor p ajustado para genes diferencialmente expresados en el análisis con todas las muestras (A) y sin valores atípicos (B).

A Test de Wald: CD8 Positivo vs Negativo

	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>
CXCL9	1932.233	2.293682	2.259252e-05	0.0124033

B Test de Wald: CD8 Positivo vs Negativo (sin valores atípicos)

	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>
CXCL9	1502.891	2.108095	5.217272e-05	0.02864282

En este caso, únicamente el gen CXCL9 (OMIM# 601704) estaba diferencialmente expresado entre las muestras positivas para CD8 y las negativas. El valor p ajustado era inferior al máximo establecido y el valor *fold change* indicaba que la expresión era más de 4 veces superior en tumores con linfocitos citotóxicos. Este gen codifica para una quimiocina inducida por interferón gamma denominada MIG. La función clásica asignada a las quimiocinas es la de quimiotaxis, sin embargo, Lee y Farber en 1996 demostraron que esta quimiocina junto con CXCL10 tienen como diana los linfocitos, participando en el proceso de activación de los mismos. Por lo tanto, los niveles de esta proteína son mayores en tumores con presencia de linfocitos CD8.

Estos mismos autores demostraron que CXCL9 tiene la capacidad de inhibir la neovascularización y promover un efecto antitumoral. Por ello, cabría esperar que el pronóstico para individuos con alta expresión de esta proteína y, por tanto, presencia de CD8 en el infiltrado fuese más favorable que aquellos en los que no se expresa. Esta teoría fue confirmada por Paulson *et al.* (2011) cuando establecieron que la infiltración intratumoral de linfocitos CD8 está asociada al aumento de la supervivencia en CCM.

Realmente se esperaba obtener una mayor cantidad de genes diferencialmente expresados, sin embargo, debido al tamaño muestral y a la distribución asimétrica de las muestras respecto a CD8 (7 negativos y 34 positivos) únicamente se pudo identificar un gen estadísticamente significativo.

4.3. Infiltración

Otra de las condiciones estudiadas es la delimitación del tumor. Los límites pueden estar bien definidos, separados del tejido adyacente o pueden estar mal delimitados, produciéndose la infiltración del tumor. De esta manera los 41 tumores se dividieron en estas dos clases. A continuación, se plasmó estos resultados en el análisis de componentes principales, con objetivo de encontrar una posible distribución de las muestras según su delimitación (figura 11). Como se puede apreciar no se distingue la separación de dos grupos de muestras según su infiltración.

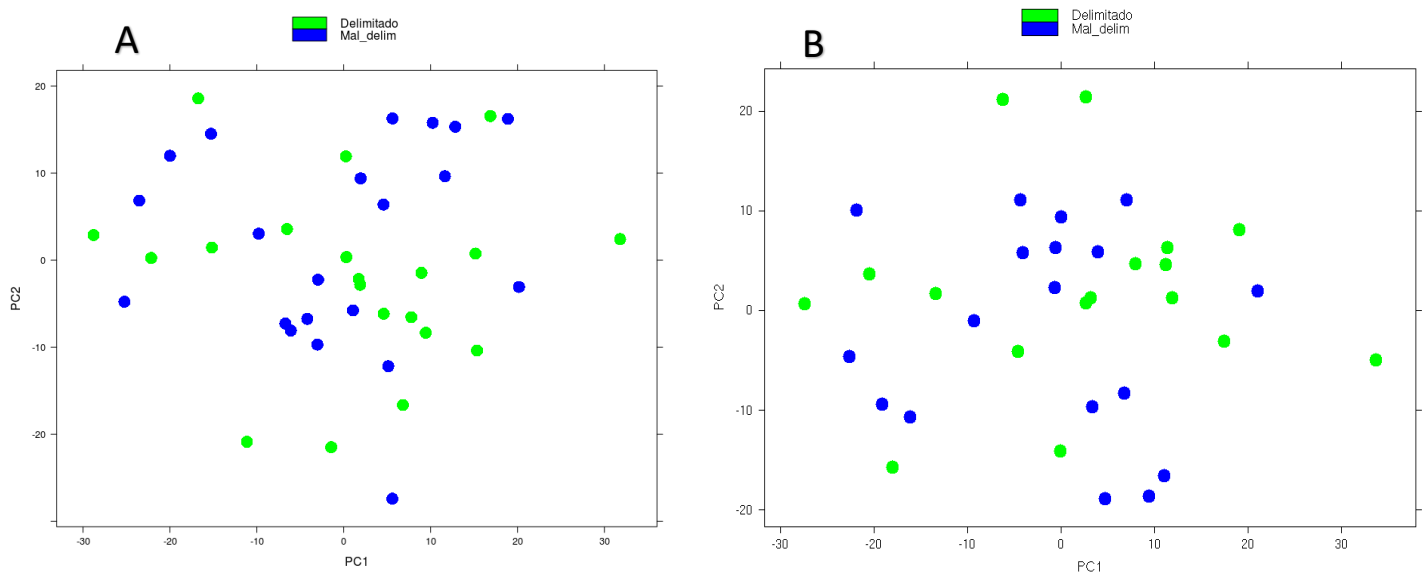
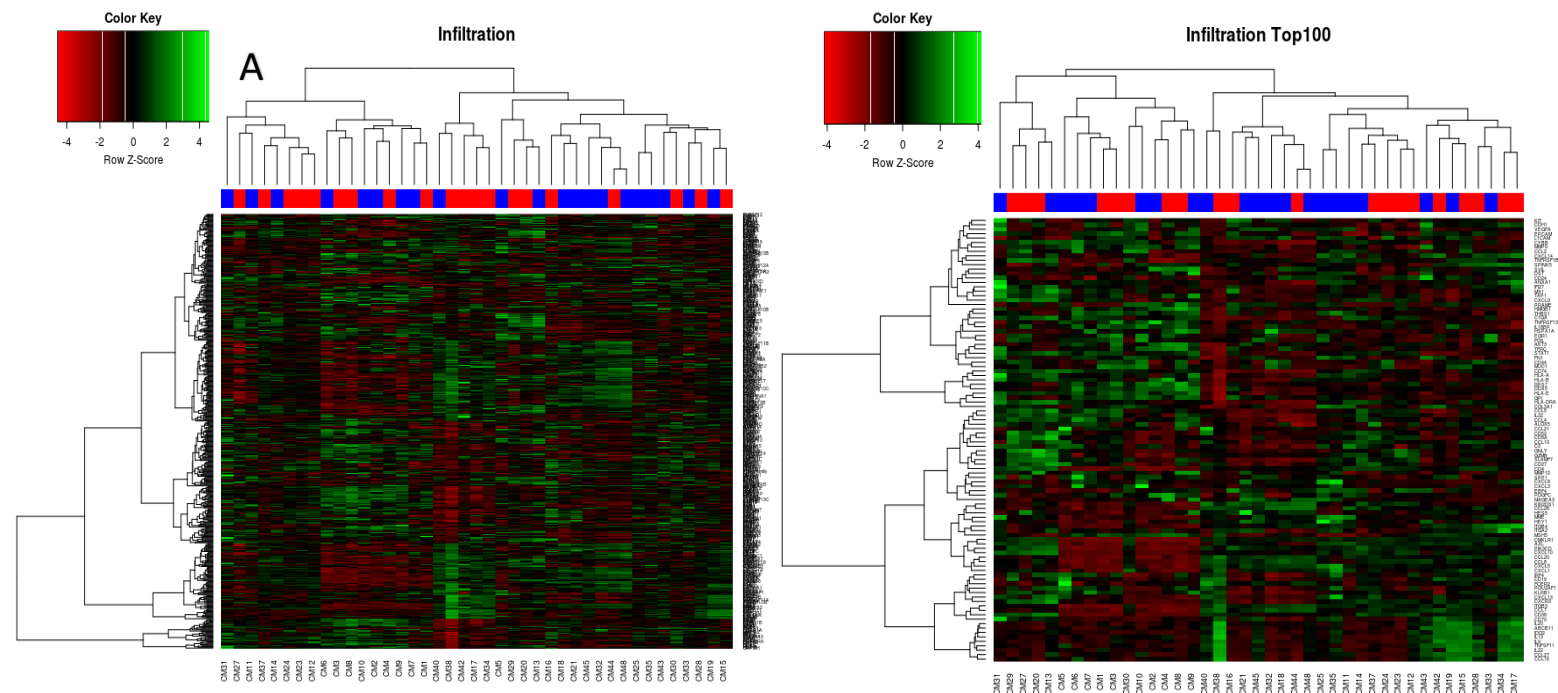


Figura 11. Diagrama del análisis de componentes principales donde se ha plasmado si los tumores están bien delimitados (verde) o mal delimitados (infiltrados, azul). A la izquierda las 41 muestras (A) y a la derecha sin los valores más atípicos (B).

A continuación, igual que con el resto de condiciones, se aplicó el algoritmo de agrupamiento con el objetivo de visualizar similitudes en los patrones de expresión y buscando una posible clasificación de las muestras según el mismo. El resultado se muestra en la figura 12. Como se puede apreciar no existe un agrupamiento definitorio de las muestras, ya que no se ha podido distinguir entre la expresión génica de tumores mal delimitados frente a los bien delimitados.



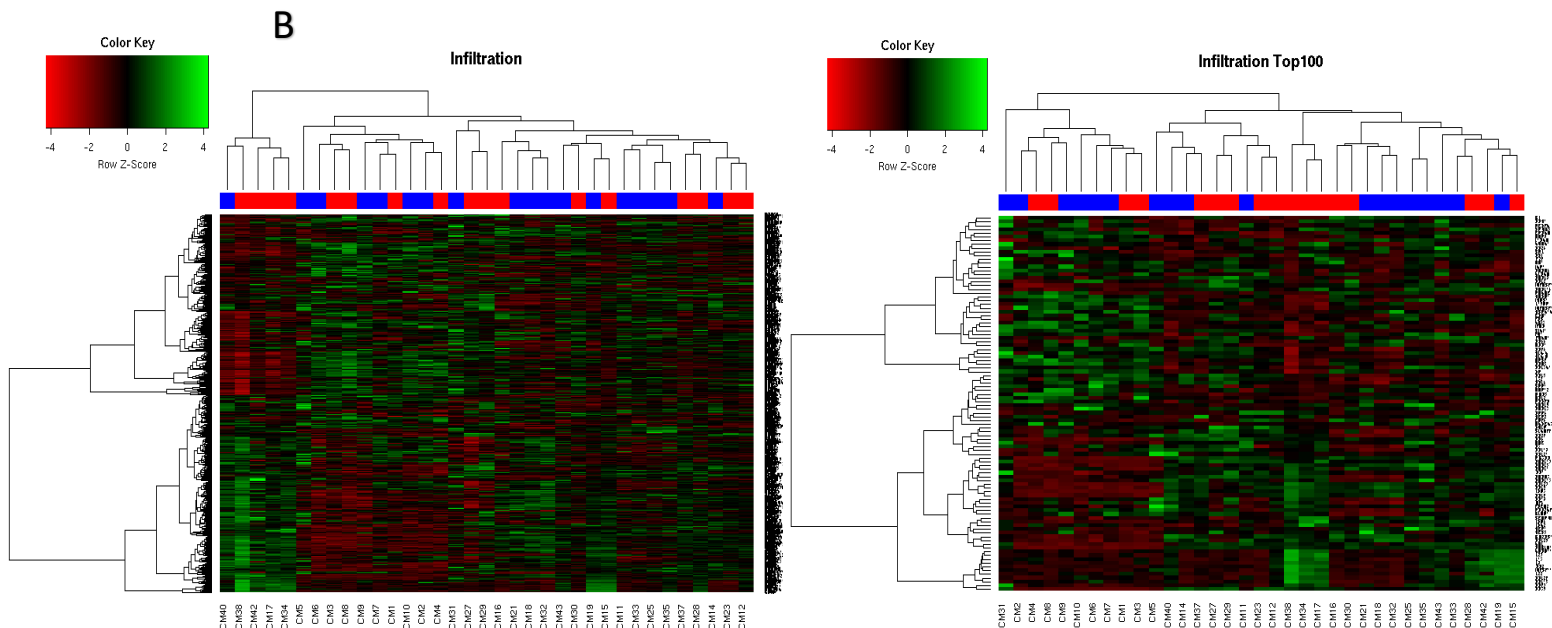


Figura 12. Agrupamiento de las 41 muestras en función de su patrón de expresión (A), agrupamiento eliminando los valores atípicos (B). La barra horizontal al comienzo indica la infiltración tumoral (rojo para mal delimitados y azul para delimitados). Los valores de expresión están indicados en una escala de color donde negro sería en la media de expresión, rojo infraexpresado, y verde sobreexpresado.

El análisis de componentes principales (PCA) y el agrupamiento según patrón de expresión son dos métodos de visualización, que permiten buscar relaciones entre las muestras. Para buscar genes diferencialmente expresados se aplicó, de nuevo, el test de Wald obteniéndose el resultado de la Tabla 6.

Tabla 6. valor de expresión (*baseMean*), logaritmo en base 2 del *fold change* valor p y valor p ajustado para genes diferencialmente expresados en el análisis con todas las muestras (A) y sin valores atípicos (B).

A Test de Wald: Mal delimitado vs Delimitado

	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>
MAGEA3	1072.3863	2.064224	5.566390e-05	0.004828843
VEGFA	1005.9044	1.788961	4.865211e-06	0.001688228
CXCL8	638.8846	1.709699	2.881328e-05	0.004006854
HSPA1A	3953.7271	1.623261	9.694787e-05	0.006268779
HEY1	296.8442	1.522337	3.464139e-05	0.004006854
FN1	4481.9547	1.321244	3.201720e-04	0.013887459

B Test de Wald: Mal delimitado vs Delimitado (sin valores atípicos)

	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>
MAGEA3	601.0392	2.081451	3.267866e-06	0.0008505336
VEGFA	942.8241	1.908926	5.595616e-06	0.0008505336
CXCL8	639.9843	1.887740	2.061270e-05	0.0020887541
HEY1	282.4507	1.679293	4.221377e-05	0.0025665972
FN1	4381.8512	1.360817	7.149396e-04	0.0241490712
SPP1	489.4130	1.284580	3.934446e-04	0.0179408713

Tras el análisis estadístico el gen MAGEA3 (OMIM# 300174) fue el que tenía una mayor diferencia de expresión entre los dos grupos de muestras. Con un valor logarítmico del *fold change* de 2.081 la expresión de este gen es más de 4 veces superior en aquellos tumores donde hay infiltración, es decir, que están mal delimitados. El valor p ajustado de todos los genes de la tabla X es inferior al máximo aceptado. La función de este gen en las células todavía no está clara, sin embargo, la presencia de la proteína codificada en células tumorales se ha asociado a un peor pronóstico en algunos tipos de cáncer (Gure, 2005). Coincidiendo con este estudio, la existencia de esta proteína en tumores mal delimitados y, por tanto, más agresivos podría relacionarse con un peor pronóstico en CCM

El segundo gen más expresado fue el factor de crecimiento endotelial vascular A o VEGFA (OMIM# 192240). Este gen es uno de los principales inductores del crecimiento de los vasos sanguíneos. En ausencia de oxígeno, las células producen mayor cantidad de VEGFA para promover la angiogénesis. La presencia de este gen en CCM se conoce desde que Brunner *et al.* (2008) demostraron su expresión. Siguiendo en esta línea, este estudio ha reflejado que los niveles de expresión son considerablemente mayores (más de 3 veces superior) en aquellos tumores que presentan una mayor agresividad (mal delimitados) frente a los delimitados. La angiogénesis es uno de los procesos fundamentales para el avance de la enfermedad, por lo que la elevada presencia de esta proteína indica una rápida vascularización, así como un alto ritmo de crecimiento causando que el tumor tenga una distribución irregular y una mala delimitación.

Por otro lado, la interleucina 8 o CXCL8 (OMIM# 146930) resultó estar más de 3 veces sobreexpresada en tumores mal delimitados frente a los delimitados, con un valor logarítmico de *fold change* de 1.89. Este gen no solo está implicado en quimiotaxis y en actividades proinflamatorias, sino que también es un potente estimulador de la angiogénesis, ya sea durante la reparación tisular o en la tumorigénesis (Strieter *et al.*, 1995). Por este motivo la desregulación de la expresión de del gen CXCL8 en tumores mal delimitados es otro de los mecanismos a través del cual se estimula la producción de nuevos vasos sanguíneos, que es uno de los factores clave necesarios para la expansión tumoral. Por lo tanto, cuanto mayor sea la expresión de factores angiogénicos mayor crecimiento tumoral se producirá asociándose, además, con una distribución irregular en CCM.

4.4. Polyomavirus

La última condición estudiada es la presencia del polyomavirus de células de Merkel en los tumores. Como se ha señalado en el apartado 1 de este trabajo, alrededor del 80% de los carcinomas de Merkel son positivos para el PyVCM por lo que quisimos ver qué relación había entre la presencia del virus y la expresión génica. La evaluación de la infección viral se hizo en anatomía patológica con técnicas inmunohistoquímicas, utilizando un anticuerpo específico del PyVCM. De manera similar a las demás condiciones, se comenzó reflejando sobre el PCA qué tumores presentan el virus y cuáles no (figura 13).

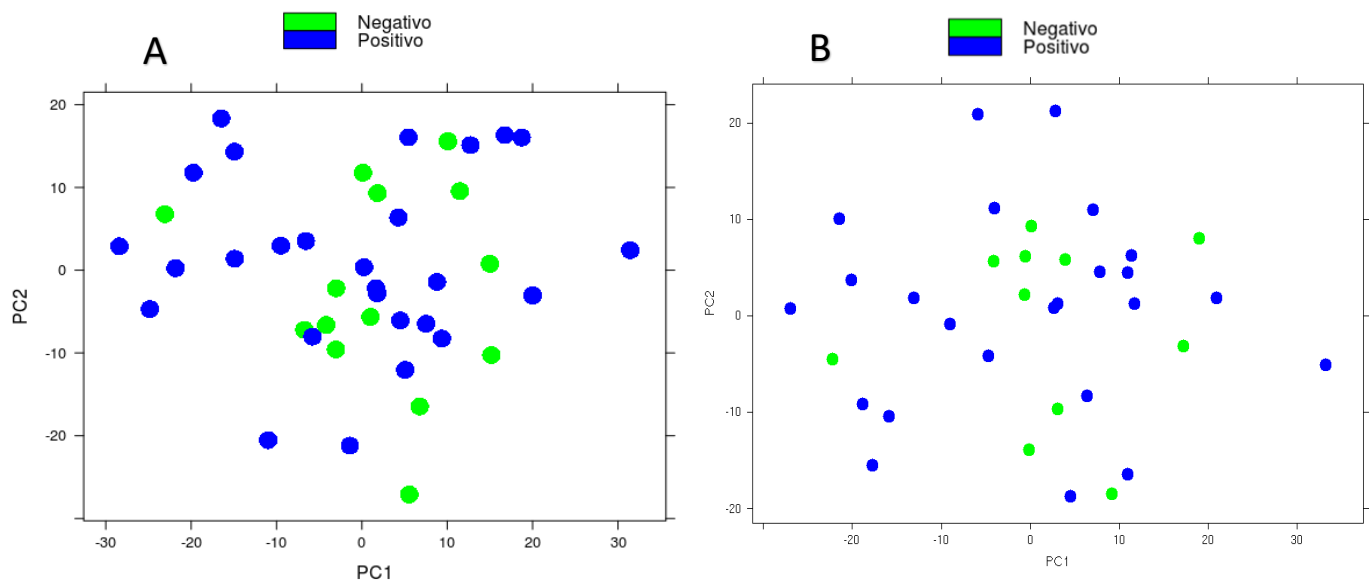
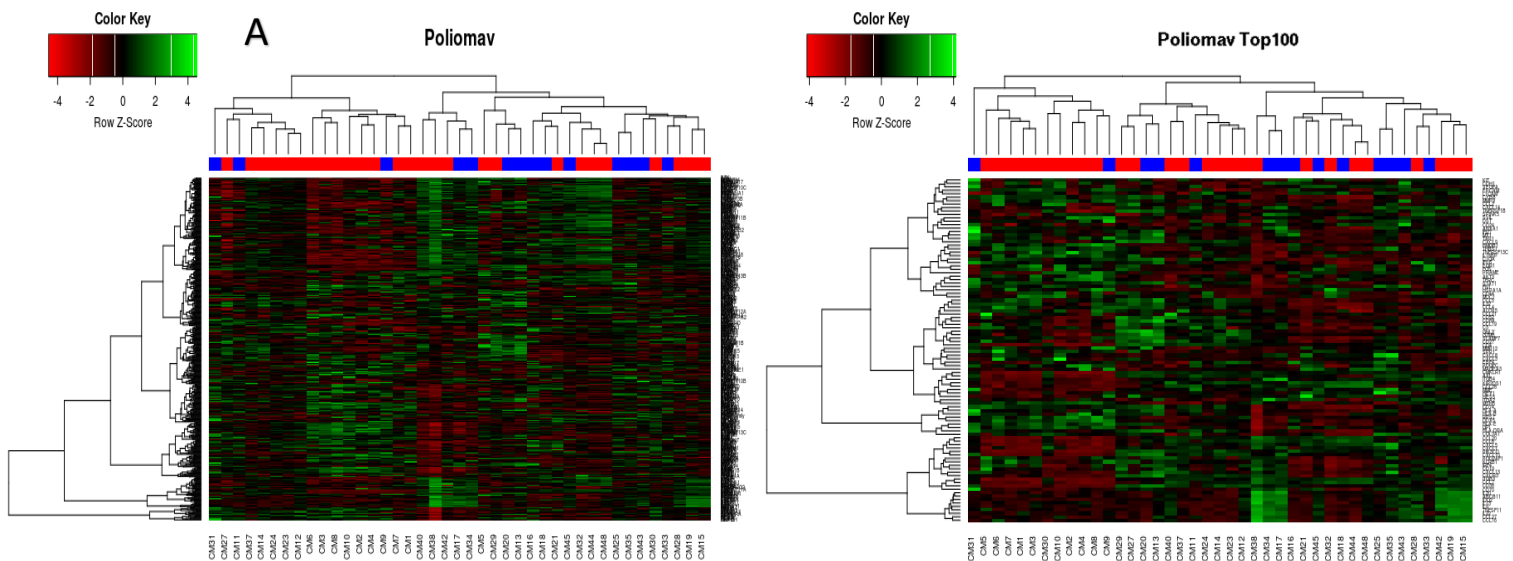


Figura 13. Diagrama del análisis de componentes principales donde se ha plasmado si los tumores presentan infección viral (verde negativos y azul positivos). A la izquierda las 41 muestras (A) y a la derecha sin los valores más atípicos (B).

Como se puede observar, no hay una agrupación clara de las muestras según su infección en el gráfico del PCA. Por ello, el siguiente paso fue aplicar el algoritmo de agrupamiento, buscando similitudes en patrones de expresión de las muestras que se puedan relacionar con la existencia de infección viral. El resultado se muestra en la figura 14. En este caso sí que parece haber cierta tendencia a la separación de las muestras en función de la presencia del PyVCM, especialmente en el agrupamiento resultado de eliminar las muestras con valores atípicos y de seleccionar los 100 genes con mayores diferencias en la expresión (apartado B figura 14)



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

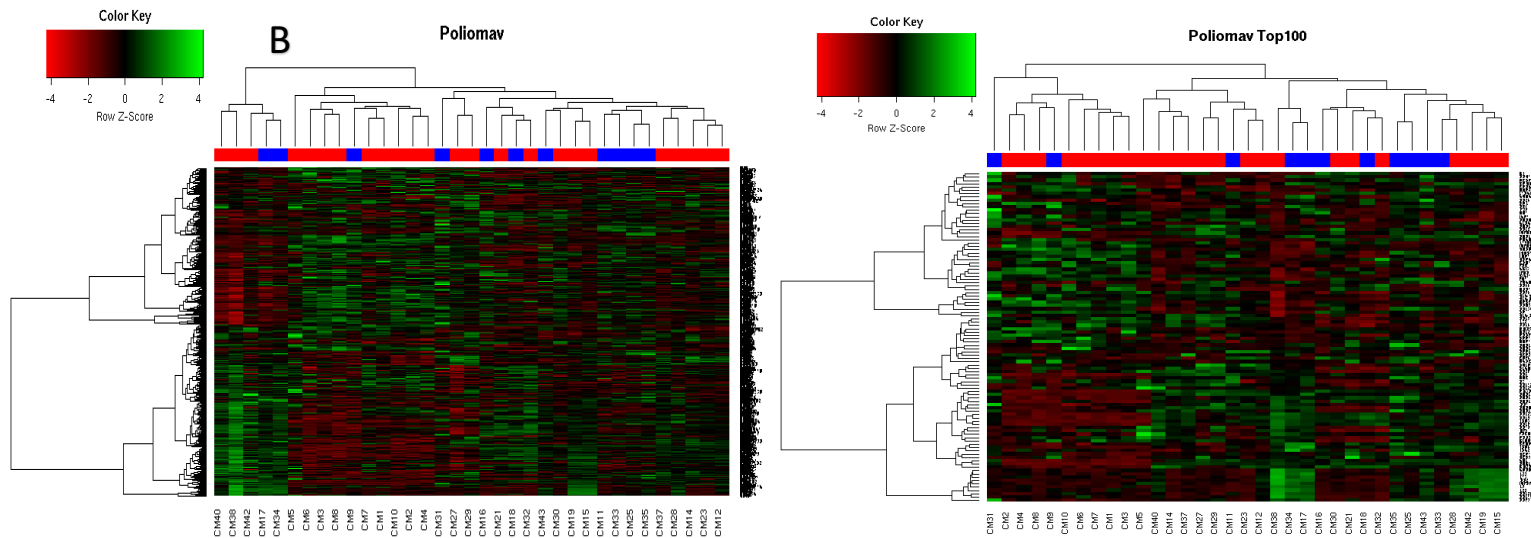


Figura 14. Agrupamiento de las 41 muestras en función de su patrón de expresión (A), agrupamiento eliminando los valores atípicos (B). La barra horizontal al comienzo indica la infección viral (rojo para positivos y azul para negativos). Los valores de expresión están indicados en una escala de color donde negro sería en la media de expresión, rojo infraexpresado, y verde sobreexpresado.

De igual manera, fue necesario determinar los genes cuya diferencia entre ambas clases es estadísticamente significativa, así como la magnitud de dicha variación. Para ello se volvió a realizar el test de Wald, los resultados del test aparecen reflejados en la Tabla 7.

Tabla 7. valor de expresión (*baseMean*), logaritmo en base 2 del *fold change*, valor p y valor p ajustado para genes diferencialmente expresados en el análisis con todas las muestras (A) y sin valores atípicos (B).

A Test de Wald: Polyomavirus Positivo vs Negativo				
	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>
MUC1	7246.5893	2.039437	2.525190e-04	7.098589e-03
TNFRSF13C	2666.2721	1.790175	4.683092e-07	4.739289e-05
IL18BP	2201.8968	1.351242	1.232822e-05	5.915049e-04
RPS7	40127.7882	1.279178	4.648641e-04	1.069187e-02
CD44	6610.4790	1.168767	1.275557e-02	9.802452e-02
MSH5	153.8176	1.075751	1.975956e-03	3.002887e-02
B Test de Wald: Polyomavirus Positivo vs Negativo (sin valores atípicos)				
	baseMean	log2FoldChange	pvalue	padj
	<numeric>	<numeric>	<numeric>	<numeric>
MUC1	7056.1227	2.011955	1.305738e-03	0.030989288
TNFRSF13C	2574.2806	1.799797	1.567276e-05	0.001229192
IL18BP	2165.5401	1.413404	4.626842e-05	0.002540136
GNLY	328.1337	1.271115	4.196914e-03	0.057602651
RPS7	40017.0150	1.196497	3.948008e-03	0.057467223
IFI27	2421.9274	-2,239389	1,294703e-07	1,63783e-05

Tras el análisis se encontraron 71 genes diferencialmente expresados con diferencias significativas entre las dos clases de muestras. En la tabla 7 se representan aquellos cuyo *fold change* es mayor.

El gen con mayor diferencia entre ambas clases fue MUC1 (OMIM # 158340), más de 4 veces sobreexpresado en tumores positivos para el PyVCM. Se han encontrado evidencias de que este gen está altamente expresado en la mayoría de carcinomas pancreáticos, biliares y colorrectales, así como en una gran cantidad de tumores de pulmón de célula pequeña (40%), gástricos (55%), uterinos (45%) y de vejiga (40%) (Tolcher *et al.*, 2003). Sin embargo, otro estudio determinó que la expresión de MUC1 en CCM no es necesariamente dependiente de la infección por PyVCM (Fernandez-Flores y Suarez-Peñaranda, 2016), aunque el tamaño muestral era reducido (20 pacientes) y únicamente se valoró la presencia, no los niveles de expresión. Alteraciones en MUC1 acompañan el desarrollo del cáncer y participan en su crecimiento, diferenciación, transformación, invasión y evasión del sistema inmune (Hollingsworth y Swanson, 2004). Por este motivo creemos que la expresión de MUC1 es uno de los mecanismos que median el desarrollo tumoral en CCM positivo para PyVCM.

Otro de los genes más expresados en tumores con infección viral fue IL18BP (OMIM# 604113), también conocido como proteína de unión a la interleucina 18. Esta citocina fue caracterizada por Okamura *et al.* (1995) como proteína inductora de interferón gamma (IFN- γ), molécula implicada en respuesta inmune adaptativa e innata, así como en la respuesta celular a infecciones virales. La elevada expresión de esta proteína en tumores positivos para PyVCM tiene como consecuencia la supresión de la IL18, reduciendo así la producción de interferón gamma que podría interferir con el desarrollo tumoral mediado por los antígenos del PyVCM. Por ello la expresión de IL18BP uno de los mecanismos por los cuales los tumores con infección viral evitan la activación de macrófagos y de vías de respuesta a infección viral mediadas por interferón gamma.

Cabe destacar también el gen IFI27 (OMIM# 600009), que resultó estar más de cuatro veces infraexpresado en tumores con infección del PyVCM presentando un valor logarítmico en base 2 del *fold change* de -2.24. Este gen codifica la proteína 27 inducida por interferón alfa. Se ha visto que la expresión de esta proteína restringe el proceso de infección y replicación de ciertos virus (Itsui *et al.*, 2006; Lucas *et al.*, 2015). Por ello, que sus niveles de expresión sean mucho menores en aquellos tumores con infección viral podría indicar que la supresión de esta proteína permite la replicación y propagación tumoral inducida por el PyVCM.

Dado el elevado número de genes identificados como diferencialmente expresados entre los tumores con infección viral presente y los tumores sin infección procedimos a realizar un nuevo agrupamiento incluyendo únicamente dichos genes (figura 15).

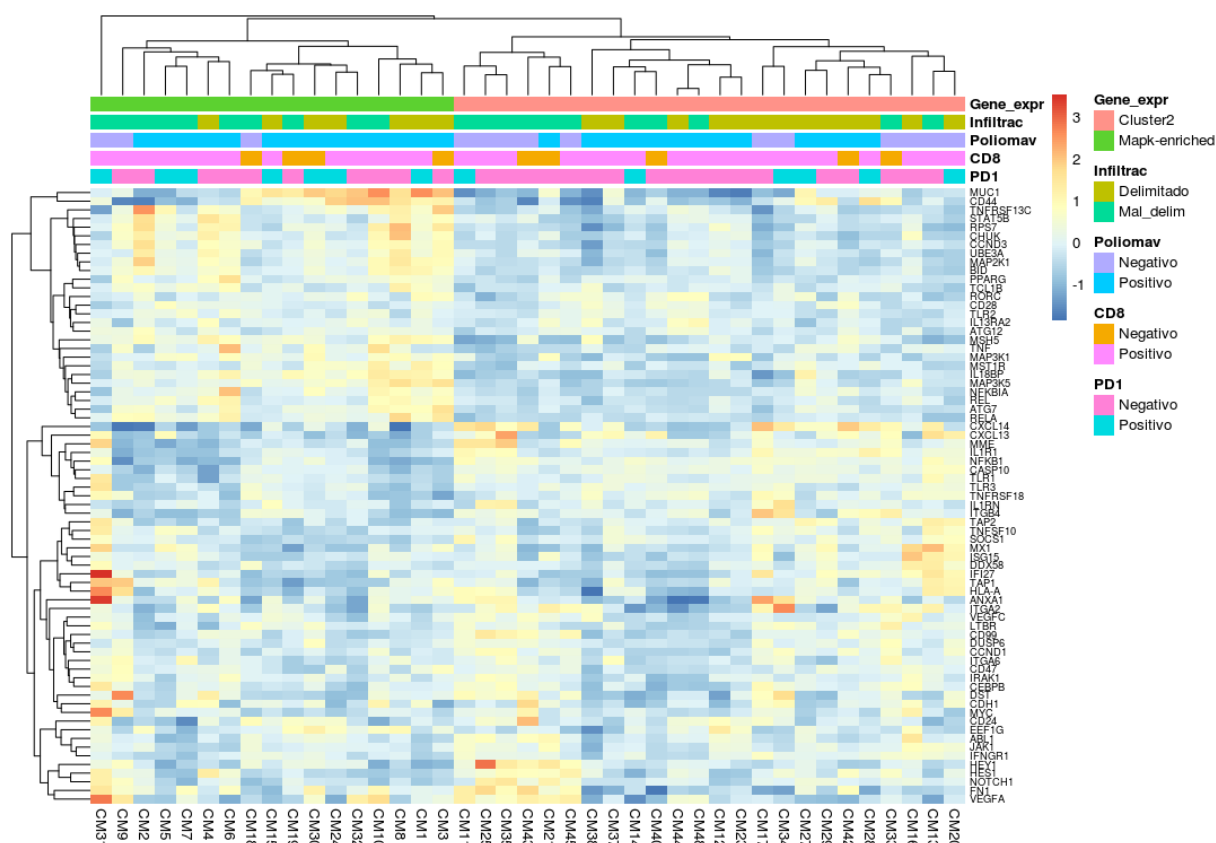


Figura 15. Agrupamiento de las muestras en función del patrón de expresión de los 71 genes obtenidos del análisis estadístico de tumores positivos para el PyVCM frente a negativos. Al comienzo se indica el valor de las cuatro condiciones estudiadas para cada muestra.

Encontramos que las muestras se dividen en dos grupos, señalados en el primer indicador horizontal de la figura 15. La primera clase (verde) engloba 17 muestras y se caracteriza por tener mayor expresión en genes relacionados con la ruta de MAP quinasas. Las 24 muestras restantes se clasifican en otro grupo (rojo) con patrones de expresión similares.

La ruta de las MAP quinasas es una familia de proteínas que juega un papel complejo en la regulación del crecimiento y división celular. Se ha intentado demostrar la activación de esta ruta en CCM, aunque no hay una evidencia clara debido a la baja incidencia de este tumor (Namikawa *et al.*, 2007; Shao, 2013). La sobreexpresión de genes relacionados con esta familia en algunas muestras de CCM podría ser una de las razones por las que este tumor presenta una alta tasa de recurrencia, así como elevada agresividad.

Por otro lado, para comprobar el efecto de las condiciones estudiadas en la separación de estas dos clases, decidimos realizar la prueba χ^2 comparando las condiciones entre sí y con la clasificación de la figura 15. No encontramos relación entre las distintas condiciones ni tampoco entre estas y la división en dos clases mostrada en la figura 15, ya que el p-valor es superior al valor máximo aceptado (0.05) para poder decir que hay significación estadística. El resultado de la prueba se refleja en la tabla 8.

Tabla 8. P-valor resultado de la prueba χ^2 comparando las condiciones entre sí y con la división en dos clases obtenida en la figura X.

Parámetro	P-valor
Polyomavirus	
CD8	1
PD1	1
Infiltración	0.095
Grupo de expresión	0.092
CD8	
PD1	0.242
Infiltración	0.462
Grupo de expresión	1
PD1	
Infiltración	1
Grupo de expresión	0.323

5. CONCLUSIONES

Partiendo de los objetivos planteados inicialmente, se pueden resumir las siguientes conclusiones:

1. Existen 11 genes con expresión significativamente distinta entre tumores PD-1 positivos y PD-1 negativos con especial mención a HLA-DR, CD74 y CIITA, sobreexpresados en muestras PD-1 positivas y relacionados con **presentación antigénica**.
2. Únicamente encontramos el gen CXCL9 diferencialmente expresado entre individuos positivos y negativos para CD8. Sin embargo, se puede relacionar con el **reclutamiento de linfocitos** y el aumento de la supervivencia en CCM.
3. Encontramos 11 genes con expresión significativamente distinta entre tumores mal delimitados, con infiltración y los tumores con límites bien definidos. A destacar MAGEA3, VEGFA y CXCL8 asociados a un **mal pronóstico** y a una rápida vascularización tumoral respectivamente.
4. La expresión diferencial según infección por PyVCM fue la más destacada con 71 genes significativamente distintos entre positivos y negativos para el virus, a destacar MUC1, IL18BP y IFI27 que parecen estar implicados en el **desarrollo tumoral** mediado por el PyVCM. A partir del patrón de expresión de los 71 genes se pudo agrupar las muestras en dos clases, una de ellas con mayor expresión de genes relacionados con la familia de MAP quinasas, aunque no se pudo relacionar esta agrupación con ninguna de las cuatro condiciones (CD8, PD-1, infiltración y polyomavirus).

6. BIBLIOGRAFÍA.

- ADAM, J.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. (2003). Immune responses in cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, 99(1): 113-132.
- AGATA, Y.; KAWASAKI, A.; NISHIMURA, H.; ISHIDA, Y.; TSUBAT, T.; YAGITA, H.; HONJO, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology*, 8(5): 765-772.
- AGELLI, M.; CLEGG, L.; BECKER, J.; ROLLISON, D. (2010). The Etiology and Epidemiology of Merkel Cell Carcinoma. *Current Problems in Cancer*, 34(1): 14-37.
- ANAND, P.; KUNNUMAKARA, A.; SUNDARAM, C.; HARIKUMAR, K.; THARAKAN, S.; LAI, O.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. (2008). Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharmaceutical Research*, 25(9): 2097-2116.
- ANCRILE, B.; LIM, K.; COUNTER, C. (2007). Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes & Development*, 21(14): 1714-1719.
- BALKWILL, F. (2005). Immunology for the next generation. *Nature Reviews Immunology*, 5(6): 509-512.
- BALKWILL, F.; CHARLES, K.; MANTOVANI, A. (2005). Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7(3): 211-217.
- BALKWILL, F.; COUSSENS, L. (2004). Cancer: An inflammatory link. *Nature*, 431(7007): 405-406.
- BECKER, J.; STANG, A.; DECAPRIO, J.; CERRONI, L.; LEBBÉ, C.; VENESS, M.; NGHIEM, P. (2017). Merkel cell carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*, 3, p.17077.
- BRUNNER, M.; THURNHER, D.; PAMMER, J.; GELEFF, S.; HEIDUSCHKA, G.; REINISCH, C.; PETZELBAUER, P.; EROVIC, B. (2008). Expression of VEGF-A/C, VEGF-R2, PDGF- α/β , c-kit, EGFR, Her-2/Neu, Mcl-1 and Bmi-1 in Merkel cell carcinoma. *Modern Pathology*, 21(7): 876-884.
- CARLINO, M.; LONG, G.; KEFFORD, R.; RIZOS, H. (2015). Targeting oncogenic BRAF and aberrant MAPK activation in the treatment of cutaneous melanoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 96(3): 385-398.
- CARUSO, C. (2004). Aging, Longevity, Inflammation, and Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1028(1): 1-13.
- DIENSTMANN, R.; JANG, I.; BOT, B.; FRIEND, S.; GUINNEY, J. (2015). Database of Genomic Biomarkers for Cancer Drugs and Clinical Targetability in Solid Tumors. *Cancer Discovery*, 5(2): 118-123.
- DRUKER, B.; GUILHOT, F.; O'BRIEN, S.; GATHMANN, I.; KANTARJIAN, H.; GATTERMANN, N.; DEININGER, M.; SILVER, R.; GOLDMAN, J.; STONE, R.; CERVANTES, F.; HOCHHAUS, A.; POWELL, B.; GABRILOVE, J.; ROUSSELOT, P.; REIFFERS, J.; CORNELISSEN, J.; HUGHES, T.; AGIS, H.; FISCHER, T.; VERHOEF, G.; SHEPHERD, J.; SAGLIO, G.; GRATWOHL, A.; NIELSEN, J.; RADICH, J.; SIMONSSON, B.; TAYLOR, K.; BACCARANI, M.; SO, C.; LETVAK, L.; LARSON, R. (2006). Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 355(23): 2408-2417.

- DUNN, G.; OLD, L.; SCHREIBER, R. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22(1): 329-360.
- FARBER, J. (1997). Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, 61(3): 246-257.
- FENG, H.; SHUDA, M.; CHANG, Y.; MOORE, P. (2008). Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science*, 319(5866): 1096-1100.
- FERNANDEZ-FLORES, A.; SUAREZ-PENARANDA, J. (2016). Expression of MUC1 by Merkel Cell Carcinoma is not Dependent on Merkel Cell Polyomavirus Infection. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 24(2): e9-e10.
- GOH, G.; WALRADT, T.; MARKAROV, V.; BLOM, A.; RIAZ, N.; DOUMANI, R.; STAFSTROM, K.; MOSHIRI, A.; YELISTRATOVA, L.; LEVINSOHN, J.; CHAN, T.; NGHIEM, P.; LIFTON, R.; CHOI, J. (2015). Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget*, 7(3): 3403-3415.
- GONZÁLEZ-VELA, M.; CURIOL-OLMO, S.; DERDAK, S.; BELTRAN, S.; SANTIBAÑEZ, M.; MARTÍNEZ, N.; CASTILLO-TRUJILLO, A.; GUT, M.; SÁNCHEZ-PACHECO, R.; ALMARAZ, C.; CERECEDA, L.; LLOMBART, B.; AGRAZ-DOBLAS, A.; REVERT-ARCE, J.; LÓPEZ GUERRERO, J.; MOLLEJO, M.; MARRÓN, P.; ORTIZ-ROMERO, P.; FERNANDEZ-CUESTA, L.; VARELA, I.; GUT, I.; CERRONI, L.; PIRIS, M.; VAQUÉ, J. (2017). Shared Oncogenic Pathways Implicated in Both Virus-Positive and UV-Induced Merkel Cell Carcinomas. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(1): 197-206.
- GRANADOS GARCÍA, M.; HERRERA GÓMEZ, Á. (2010). *Manual de oncología*. 4ª Ed. McGraw-Hill. México.
- GURE, A. (2005). Cancer-Testis Genes Are Coordinately Expressed and Are Markers of Poor Outcome in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 11(22): 8055-8062.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5): 646-674.
- HIGAKI-MORI, H.; KUWAMOTO, S.; IWASAKI, T.; KATO, M.; MURAKAMI, I.; NAGATA, K.; SANO, H.; HORIE, Y.; YOSHIDA, Y.; YAMAMOTO, O.; ADACHI, K.; NANBA, E.; HAYASHI, K. (2012). Association of Merkel cell polyomavirus infection with clinicopathological differences in Merkel cell carcinoma. *Human Pathology*, 43(12): 2282-2291.
- HOLLINGSWORTH, M.; SWANSON, B. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer*, 4(1): 45-60.
- ITSUI, Y.; SAKAMOTO, N.; KUROSAKI, M.; KANAZAWA, N.; TANABE, Y.; KOYAMA, T.; TAKEDA, Y.; NAKAGAWA, M.; KAKINUMA, S.; SEKINE, Y.; MAEKAWA, S.; ENOMOTO, N.; WATANABE, M. (2006). Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *Journal of Viral Hepatitis*, 13(10): 690-700.
- JOUARY, T.; LEYRAL, C.; DRENO, B.; DOUSSAU, A.; SASSOLAS, B.; BEYLOT-BARRY, M.; RENAUD-VILMER, C.; GUILLOT, B.; BERNARD, P.; LOK, C.; BEDANE, C.; CAMBAZARD, F.; MISERY, L.; ESTEVE, E.; DALAC, S.; MACHET, L.; GRANGE, F.; YOUNG, P.; GRANEL-BROCARD, F.; TRUCHETET, F.; VERGIER, B.; DELAUNAY, M.; GROB, J. (2011). Adjuvant prophylactic regional radiotherapy

versus observation in stage I Merkel cell carcinoma: a multicentric prospective randomized study. *Annals of Oncology*, 23(4): 1074-1080.

KAAE, J.; HANSEN, A.; BIGGAR, R.; BOYD, H.; MOORE, P.; WOHLFAHRT, J.; MELBYE, M. (2010). Merkel Cell Carcinoma: Incidence, Mortality, and Risk of Other Cancers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 102(11): 793-801.

KIM, J.; MCNIFF, J. (2008). Nuclear expression of survivin portends a poor prognosis in Merkel cell carcinoma. *Modern Pathology*, 21(6): 764-769.

LIU, W.; YANG, R.; PAYNE, A.; SCHOWALTER, R.; SPURGEON, M.; LAMBERT, P.; XU, X.; BUCK, C.; YOU, J. (2016). Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection. *Cell Host & Microbe*, 19(6): 775-787.

LUCAS, T.; RICHNER, J.; DIAMOND, M. (2015). The Interferon-Stimulated Genefi27l2a Restricts West Nile Virus Infection and Pathogenesis in a Cell-Type- and Region-Specific Manner. *Journal of Virology*, 90(5): 2600-2615.

MOLL, I.; ROESSLER, M.; BRANDNER, J.; EISPERT, A.; HOUDEK, P.; MOLL, R. (2005). Human Merkel cells – aspects of cell biology, distribution and functions. *European Journal of Cell Biology*, 84(2-3): 259-271.

NAMIKAWA, K.; NAKAMURA, Y.; TAKAHASHI, T.; OTSUKA, F. (2007). Is the MAPK pathway involved in the aggressivity of Merkel cell carcinoma?. *European journal of dermatology*, 17(6): 556

NGHIEM, P.; BHATIA, S.; LIPSON, E.; KUDCHADKAR, R.; MILLER, N.; ANNAMALAI, L.; BERRY, S.; CHARTASH, E.; DAUD, A.; FLING, S.; FRIEDLANDER, P.; KLUGER, H.; KOHRT, H.; LUNDGREN, L.; MARGOLIN, K.; MITCHELL, A.; OLENCKI, T.; PARDOLL, D.; REDDY, S.; SHANTHA, E.; SHARFMAN, W.; SHARON, E.; SHEMANSKI, L.; SHINOHARA, M.; SUNSHINE, J.; TAUBE, J.; THOMPSON, J.; TOWNSON, S.; YEARLEY, J.; TOPALIAN, S.; CHEEVER, M. (2016). PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 374(26): 2542-2552.

OKAMURA, H.; TSUTSUI, H.; KOMATSU, T.; YUTSUDO, M.; HAKURA, A.; TANIMOTO, T.; TORIGOE, K.; OKURA, T.; NUKADA, Y.; HATTORI, K.; AKITA, K.; NAMBA, M.; TANABE, F.; KONISHI, K.; FUKUDA, S.; KURIMOTO, M. (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature*, 378(6552): 88-91.

PARDOLL, D. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4): 252-264.

PAULSON, K.; IYER, J.; TEGEDER, A.; THIBODEAU, R.; SCHELTER, J.; KOBAYASHI, S.; SCHRAMA, D.; SIMONSON, W.; LEMOS, B.; BYRD, D.; KOELLE, D.; GALLOWAY, D.; LEONARD, J.; MADELEINE, M.; ARGENYI, Z.; DISIS, M.; BECKER, J.; CLEARY, M.; NGHIEM, P. (2011). Transcriptome-Wide Studies of Merkel Cell Carcinoma and Validation of Intratumoral CD8+ Lymphocyte Invasion As an Independent Predictor of Survival. *Journal of Clinical Oncology*, 29(12): 1539-1546.

ROBERTSON, J.; LIANG, E.; MARTIN, R. (2015). Epidemiology of Merkel cell carcinoma in New Zealand: a population-based study. *British Journal of Dermatology*, 173(3): 835-837.

ROSENBERG, S.; RESTIFO, N.; YANG, J.; MORGAN, R.; DUDLEY, M. (2008). Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(4): 299-308.

- SCHADENDORF, D.; LEBBÉ, C.; ZUR HAUSEN, A.; AVRIL, M.; HARIHARAN, S.; BHARMAL, M.; BECKER, J. (2017). Merkel cell carcinoma: Epidemiology, prognosis, therapy and unmet medical needs. *European Journal of Cancer*, 71: 53-69.
- SHAH, M.; LORIGAN, P.; O'BRIEN, M.; FOSSELLA, F.; MOORE, K.; BHATIA, S.; KIRBY, M.; WOLL, P. (2016). Phase I study of IMG901, a CD56-targeting antibody-drug conjugate, in patients with CD56-positive solid tumors. *Investigational New Drugs*, 34(3): 290-299.
- SHAO, Q. (2013). A Proteomic Study of Human Merkel Cell Carcinoma. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*, 06(11): 275-282
- SHUDA, M.; ARORA, R.; KWUN, H.; FENG, H.; SARID, R.; FERNÁNDEZ-FIGUERAS, M.; TOLSTOV, Y.; GJOERUP, O.; MANSUKHANI, M.; SWERDLOW, S.; CHAUDHARY, P.; KIRKWOOD, J.; NALESNIK, M.; KANT, J.; WEISS, L.; MOORE, P.; CHANG, Y. (2009). Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *International Journal of Cancer*, 125(6): 1243-1249.
- SHUDA, M.; FENG, H.; KWUN, H.; ROSEN, S.; GJOERUP, O.; MOORE, P.; CHANG, Y. (2008). T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42): 16272-16277.
- SIBLEY, R.; DEHNER, L.; ROSAI, J. (1985). Primary neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin: morphologic diversity and implications thereof. *The American Journal of Surgical Pathology*, 9(2): 95-108.
- SIHTO, H.; KUKKO, H.; KOLJONEN, V.; SANKILA, R.; BOHLING, T.; JOENSUU, H. (2011). Merkel Cell Polyomavirus Infection, Large T Antigen, Retinoblastoma Protein and Outcome in Merkel Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 17(14): 4806-4813.
- SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGÍA MÉDICA (SEOM), 2018. Las cifras del cáncer en España, <https://www.seom.org/es/noticias/106525-las-cifras-del-cancer-en-espana-2018>. (documento abierto)
- SPURGEON, M.; LAMBERT, P. (2013). Merkel cell polyomavirus: A newly discovered human virus with oncogenic potential. *Virology*, 435(1): 118-130.
- STAKAITYTĖ, G.; WOOD, J.; KNIGHT, L.; ABDUL-SADA, H.; ADZAHAR, N.; NWOGU, N.; MACDONALD, A.; WHITEHOUSE, A. (2014). Merkel Cell Polyomavirus: Molecular Insights into the Most Recently Discovered Human Tumour Virus. *Cancers*, 6(3): 1267-1297.
- STEWART, B.; WILD, C.P. (2014). World cancer report 2014. Lyon: *International Agency for Research in Cancer*.
- STRIETER, R.; POLVERINI, P.; ARENBERG, D.; KUNKEL, S. (1995). THE ROLE OF CXC CHEMOKINES AS REGULATORS OF ANGIOGENESIS. *Shock*, 4(3): 155-160.
- TAI, P.; YU, E.; WINQUIST, E.; HAMMOND, A.; STITT, L.; TONITA, J.; GILCHRIST, J. (2000). Chemotherapy in Neuroendocrine/Merkel Cell Carcinoma of the Skin: Case Series and Review of 204 Cases. *Journal of Clinical Oncology*, 18(12): 2493-2499.
- TEJERA-VAQUERIZO, A.; DESCALZO-GALLEGO, M.; OTERO-RIVAS, M.; POSADA-GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ-PAZOS, L.; PASTUSHENKO, I.; MARCOS-GRAGERA, R.; GARCÍA-DOVAL, I. (2016). Incidencia y mortalidad del cáncer cutáneo en España: revisión sistemática y metaanálisis. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 107(4): 318-328.

TILLING, T.; MOLL, I. (2012). Which Are the Cells of Origin in Merkel Cell Carcinoma?. *Journal of Skin Cancer*, 2012: 1-6.

TOLCHER, A.; OCHOA, L.; HAMMOND, L.; PATNAIK, A.; EDWARDS, T.; TAKIMOTO, C.; SMITH, L.; DE BONO, J.; SCHWARTZ, G.; MAYS, T.; JONAK, Z.; JOHNSON, R.; DEWITTE, M.; MARTINO, H.; AUDETTE, C.; MAES, K.; CHARI, R.; LAMBERT, J.; ROWINSKY, E. (2003). Cantuzumab Mertansine, a Maytansinoid Immunoconjugate Directed to the CanAg Antigen: A Phase I, Pharmacokinetic, and Biologic Correlative Study. *Journal of Clinical Oncology*, 21(2): 211-222.

TOLSTOV, Y.; PASTRANA, D.; FENG, H.; BECKER, J.; JENKINS, F.; MOSCHOS, S.; CHANG, Y.; BUCK, C.; MOORE, P. (2009). Human Merkel cell polyomavirus infection II. MCV is a common human infection that can be detected by conformational capsid epitope immunoassays. *International Journal of Cancer*, 125(6): 1250-1256.

TOPALIAN, S.; BHATIA, S.; HOLLEBECQUE, A.; AWADA, A.; BOER, J.; KUDCHADKAR, R.; GONCALVES, A.; DELORD, J.; MARTENS, U.; PICAZO, J.; OAKNIN, A.; SPANOS, W.; ALJUMAILY, R.; SHARFMAN, W.; RAO, S.; SOUMAORO, I.; CAO, A.; NGHIEM, P.; SCHADENDORF, D. (2017). Abstract CT074: Non-comparative, open-label, multiple cohort, phase 1/2 study to evaluate nivolumab (NIVO) in patients with virus-associated tumors (CheckMate 358): Efficacy and safety in Merkel cell carcinoma (MCC). *Cancer Research*, 77(13 Supplement): CT074-CT074.

TOPALIAN, S.; DRAKE, C.; PARDOLL, D. (2015). Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell*, 27(4): 450-461.

TOPALIAN, S.; HODI, F.; BRAHMER, J.; GETTINGER, S.; SMITH, D.; MCDERMOTT, D.; POWDERLY, J.; CARVAJAL, R.; SOSMAN, J.; ATKINS, M.; LEMING, P.; SPIGEL, D.; ANTONIA, S.; HORN, L.; DRAKE, C.; PARDOLL, D.; CHEN, L.; SHARFMAN, W.; ANDERS, R.; TAUBE, J.; MCMILLER, T.; XU, H.; KORMAN, A.; JURE-KUNKEL, M.; AGRAWAL, S.; MCDONALD, D.; KOLLIA, G.; GUPTA, A.; WIGGINTON, J.; SZNOL, M. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *New England Journal of Medicine*, 366(26): 2443-2454.

VAN KEYMEULEN, A.; MASCRE, G.; YOUSEFF, K.; HAREL, I.; MICHAUX, C.; DE GEEST, N.; SZPALSKI, C.; ACHOURI, Y.; BLOCH, W.; HASSAN, B.; BLANPAIN, C. (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(11): i26-i26.

VISCIDI, R.; ROLLISON, D.; SONDAK, V.; SILVER, B.; MESSINA, J.; GIULIANO, A.; FULP, W.; AJIDAHUN, A.; RIVANERA, D. (2011). Age-Specific Seroprevalence of Merkel Cell Polyomavirus, BK Virus, and JC Virus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(10): 1737-1743.

ZENG, Q.; GOMEZ, B.; VISCIDI, R.; PENG, S.; HE, L.; MA, B.; WU, T.; HUNG, C. (2012). Development of a DNA vaccine targeting Merkel cell polyomavirus. *Vaccine*, 30(7): 1322-1327.

7. ANEXO

Tabla A1. Combinación de 12 *primer forward* con 8 *reverse* obteniendo 96 marcajes distintos.

R ↓	F →	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RA		RA;CGATGT F1;ATTGGC	RA;CGATGT F2;GCCAAT	RA;CGATGT F3;TGACCA	RA;CGATGT F3;TGACCA	RA;CGATGT F5;TAGCTT	RA;CGATGT F6;ACATCG	RA;CGATGT F7;GGCTAC	RA;CGATGT F8;AAGCTA	RA;CGATGT F9;CGTGAT	RA;CGATGT F10;TGGTCA	RA;CGATGT F11;CTGATC	RA;CGATG F12;GATCTG
RB		RB;GCCAAT F1;ATTGGC	RB;GCCAAT F2;GCCAAT	RB;GCCAAT F3;TGACCA	RB;GCCAAT F3;TGACCA	RB;GCCAAT F5;TAGCTT	RB;GCCAAT F6;ACATCG	RB;GCCAAT F7;GGCTAC	RB;GCCAAT F8;AAGCTA	RB;GCCAAT F9;CGTGAT	RB;GCCAAT F10;TGGTCA	RB;GCCAAT F11;CTGATC	RB;GCCAAT F12;GATCTG
RC		RC;CAGATC F1;ATTGGC	RC;CAGATC F2;GCCAAT	RC;CAGATC F3;TGACCA	RC;CAGATC F3;TGACCA	RC;CAGATC F5;TAGCTT	RC;CAGATC F6;ACATCG	RC;CAGATC F7;GGCTAC	RC;CAGATC F8;AAGCTA	RC;CAGATC F9;CGTGAT	RC;CAGATC F10;TGGTCA	RC;CAGATC F11;CTGATC	RC;CAGATC F12;GATCTG
RD		RD;GCCTAA F1;ATTGGC	RD;GCCTAA F2;GCCAAT	RD;GCCTAA F3;TGACCA	RD;GCCTAA F3;TGACCA	RD;GCCTAA F5;TAGCTT	RD;GCCTAA F6;ACATCG	RD;GCCTAA F7;GGCTAC	RD;GCCTAA F8;AAGCTA	RD;GCCTAA F9;CGTGAT	RD;GCCTAA F10;TGGTCA	RD;GCCTAA F11;CTGATC	RD;GCCTAA F12;GATCTG
RE		RE;CACTGT F1;ATTGGC	RE;CACTGT F2;GCCAAT	RE;CACTGT F3;TGACCA	RE;CACTGT F3;TGACCA	RE;CACTGT F5;TAGCTT	RE;CACTGT F6;ACATCG	RE;CACTGT F7;GGCTAC	RE;CACTGT F8;AAGCTA	RE;CACTGT F9;CGTGAT	RE;CACTGT F10;TGGTCA	RE;CACTGT F11;CTGATC	RE;CACTGT F12;GATCTG
RF		RF;ATTGGC F1;ATTGGC	RF;ATTGGC F2;GCCAAT	RF;ATTGGC F3;TGACCA	RF;ATTGGC F3;TGACCA	RF;ATTGGC F5;TAGCTT	RF;ATTGGC F6;ACATCG	RF;ATTGGC F7;GGCTAC	RF;ATTGGC F8;AAGCTA	RF;ATTGGC F9;CGTGAT	RF;ATTGGC F10;TGGTCA	RF;ATTGGC F11;CTGATC	RF;ATTGGC F12;GATCTG
RG		RG;TCAAGT F1;ATTGGC	RG;TCAAGT F2;GCCAAT	RG;TCAAGT F3;TGACCA	RG;TCAAGT F3;TGACCA	RG;TCAAGT F5;TAGCTT	RG;TCAAGT F6;ACATCG	RG;TCAAGT F7;GGCTAC	RG;TCAAGT F8;AAGCTA	RG;TCAAGT F9;CGTGAT	RG;TCAAGT F10;TGGTCA	RG;TCAAGT F11;CTGATC	RG;TCAAGT F12;GATCTG
RH		RH;CGTACG F1;ATTGGC	RH;CGTACG F2;GCCAAT	RH;CGTACG F3;TGACCA	RH;CGTACG F3;TGACCA	RH;CGTACG F5;TAGCTT	RH;CGTACG F6;ACATCG	RH;CGTACG F7;GGCTAC	RH;CGTACG F8;AAGCTA	RH;CGTACG F9;CGTGAT	RH;CGTACG F10;TGGTCA	RH;CGTACG F11;CTGATC	RH;CGTACG F12;GATCTG

Tabla A2. Primera librería obtenida tras la reacción en el procesador HTG con 10 muestras de CCM.

#	Sample (3µl)	Sample Plate	Well	Forward primer (3µl)	Reverse primer (3µl)
1	CM1	31012017_ASP_CM_IO	A1	F1	RA
2	CM2	31012017_ASP_CM_IO	B1	F1	RB
3	CM3	31012017_ASP_CM_IO	C1	F1	RC
4	CM4	31012017_ASP_CM_IO	D1	F1	RD
5	CM5	31012017_ASP_CM_IO	E1	F1	RE
6	CM6	31012017_ASP_CM_IO	F1	F1	RF
7	CM7	31012017_ASP_CM_IO	G1	F1	RG
8	CM8	31012017_ASP_CM_IO	H1	F1	RH
9	CM9	31012017_ASP_CM_IO	A2	F2	RA
10	CM10	31012017_ASP_CM_IO	B2	F2	RB
11	ASPS 001	31012017_ASP_CM_IO	C2	F2	RC
12	ASPS 003	31012017_ASP_CM_IO	D2	F2	RD
13	ASPS 004	31012017_ASP_CM_IO	E2	F2	RE
14	ASPS 005	31012017_ASP_CM_IO	F2	F2	RF
15	ASPS 006	31012017_ASP_CM_IO	G2	F2	RG
16	ASPS 007	31012017_ASP_CM_IO	H2	F2	RH
17	ASPS 008	31012017_ASP_CM_IO	A3	F3	RA
18	ASPS 009	31012017_ASP_CM_IO	B3	F3	RB
19	ASPS 010	31012017_ASP_CM_IO	C3	F3	RC
20	ASPS 011	31012017_ASP_CM_IO	D3	F3	RD
21	ASPS 012	31012017_ASP_CM_IO	E3	F3	RE
22	ASPS 013	31012017_ASP_CM_IO	F3	F3	RF
23	ASPS 015	31012017_ASP_CM_IO	G3	F3	RG
24	ASPS 016	31012017_ASP_CM_IO	H3	F3	RH

Tabla A3. Segunda librería obtenida tras la reacción en el procesador HTG con 21 muestras de CCM.

#	Sample (3µl)	Sample Plate	Well	Forward primer (3µl)	Reverse primer (3µl)
1	ASPS18	02082017_ASPS_CM_IO	A1	F1	RA
2	ASPS19	02082017_ASPS_CM_IO	B1	F1	RB
3	ASPS20	02082017_ASPS_CM_IO	C1	F1	RC
4	CM11	02082017_ASPS_CM_IO	D1	F1	RD
5	CM12	02082017_ASPS_CM_IO	E1	F1	RE
6	CM13	02082017_ASPS_CM_IO	F1	F1	RF
7	CM14	02082017_ASPS_CM_IO	G1	F1	RG
8	CM15	02082017_ASPS_CM_IO	H1	F1	RH
9	CM16	02082017_ASPS_CM_IO	A2	F2	RA
10	CM17	02082017_ASPS_CM_IO	B2	F2	RB
11	CM18	02082017_ASPS_CM_IO	C2	F2	RC
12	CM19	02082017_ASPS_CM_IO	D2	F2	RD
13	CM20	02082017_ASPS_CM_IO	E2	F2	RE
14	CM21	02082017_ASPS_CM_IO	F2	F2	RF
15	CM22	02082017_ASPS_CM_IO	G2	F2	RG
16	CM23	02082017_ASPS_CM_IO	H2	F2	RH
17	CM24	02082017_ASPS_CM_IO	A3	F3	RA
18	CM25	02082017_ASPS_CM_IO	B3	F3	RB
19	CM26	02082017_ASPS_CM_IO	C3	F3	RC
20	CM27	02082017_ASPS_CM_IO	D3	F3	RD
21	CM28	02082017_ASPS_CM_IO	E3	F3	RE
22	CM29	02082017_ASPS_CM_IO	F3	F3	RF
23	CM30	02082017_ASPS_CM_IO	G3	F3	RG
24	CM31	02082017_ASPS_CM_IO	H3	F3	RH

Tabla A4. Tercera librería obtenida tras la reacción en el procesador HTG con 17 muestras de CCM. Nótese la falta de la muestra 39

#	Sample (3µl)	Sample Plate	Well	Forward primer (3µl)	Reverse primer (3µl)
1	CM32	21092017_CM_IO	A1	F1	RA
2	CM33	21092017_CM_IO	B1	F1	RB
3	CM34	21092017_CM_IO	C1	F1	RC
4	CM35	21092017_CM_IO	D1	F1	RD
5	CM36	21092017_CM_IO	E1	F1	RE
6	CM37	21092017_CM_IO	F1	F1	RF
7	CM38	21092017_CM_IO	G1	F1	RG
8	CM40	21092017_CM_IO	H1	F1	RH
9	CM41	21092017_CM_IO	A2	F2	RA
10	CM42	21092017_CM_IO	B2	F2	RB
11	CM43	21092017_CM_IO	C2	F2	RC
12	CM44	21092017_CM_IO	D2	F2	RD
13	CM45	21092017_CM_IO	E2	F2	RE
14	CM46	21092017_CM_IO	F2	F2	RF
15	CM47	21092017_CM_IO	G2	F2	RG
16	CM48	21092017_CM_IO	H2	F2	RH
17	CM49	21092017_CM_IO	A3	F3	RA
18	CM12rep	21092017_CM_IO	B3	F3	RB
19	CM22rep	21092017_CM_IO	C3	F3	RC
20	CM23rep	21092017_CM_IO	D3	F3	RD
21	CM31rep	21092017_CM_IO	E3	F3	RE
22	CM32rep	21092017_CM_IO	F3	F3	RF
23	CM44rep	21092017_CM_IO	G3	F3	RG
24	CM48rep	21092017_CM_IO	H3	F3	RH

Tabla A5. Primer *pool* de secuenciación con 24 muestras, de las cuales 10 son de este estudio.

Assay Type: mRNA		Loading Concentration: 20 pM					
Sample name	Sample dilution factor	Library concentration (pM)	% of total pool	Library dilution factor	Diluent (μL) (10 mM Tris pH 8.5)	Volume of diluted library to pool (μL)	Clean-up well location
CM1	1 : 10k	530,10	4,2%	1:5	20,00	4,72	
CM2	1 : 10k	2263,08	4,2%	1:5	20,00	1,10	
CM3	1 : 10k	1623,49	4,2%	1:5	20,00	1,54	
CM4	1 : 10k	1571,25	4,2%	1:5	20,00	1,59	
CM5	1 : 10k	3079,98	4,2%	1:10	45,00	1,62	
CM6	1 : 10k	1233,64	4,2%	1:5	20,00	2,03	
CM7	1 : 10k	3599,78	4,2%	1:10	45,00	1,39	
CM8	1 : 10k	6057,81	4,2%	1:20	95,00	1,65	
CM9	1 : 10k	978,24	4,2%	1:5	20,00	2,56	
CM10	1 : 10k	6021,92	4,2%	1:20	95,00	1,66	
ASPS001	1 : 10k	723,70	4,2%	1:5	20,00	3,45	
ASPS003	1 : 10k	157,13	4,2%	1:1	Use Neat	3,18	
ASPS004	1 : 10k	1071,20	4,2%	1:5	20,00	2,33	
ASPS005	1 : 10k	565,33	4,2%	1:5	20,00	4,42	
ASPS006	1 : 10k	1705,33	4,2%	1:5	20,00	1,47	
ASPS007	1 : 10k	1146,29	4,2%	1:5	20,00	2,18	
ASPS008	1 : 10k	3083,64	4,2%	1:10	45,00	1,62	
ASPS009	1 : 10k	1046,80	4,2%	1:5	20,00	2,39	
ASPS010	1 : 10k	1502,81	4,2%	1:5	20,00	1,66	
ASPS011	1 : 10k	625,46	4,2%	1:5	20,00	4,00	
ASPS012	1 : 10k	411,26	4,2%	1:1	Use Neat	1,22	
ASPS013	1 : 10k	1115,77	4,2%	1:5	20,00	2,24	
ASPS015	1 : 10k	1014,63	4,2%	1:5	20,00	2,46	
ASPS016	1 : 10k	1026,83	4,2%	1:5	20,00	2,43	
Total library vol (μL):						54,92	

Tabla A6. Segundo *pool* de secuenciación con 16 muestras, de las cuales 13 son de este estudio.

Assay Type: mRNA		Loading Concentration: 20 pM					
Sample name	Sample dilution factor	Library concentration (pM)	% of total pool	Library dilution factor	Diluent (μL) (10 mM Tris pH 8.5)	Volume of diluted library to pool (μL)	Clean-up well location
ASPS-018	1 : 10k	857,61	6,3%	1:5	20,00	4,37	
ASPS-019	1 : 10k	1967,14	6,3%	1:5	20,00	1,91	
ASPS-020	1 : 10k	3331,58	6,3%	1:5	20,00	1,13	
CM11	1 : 10k	3562,65	6,3%	1:5	20,00	1,05	
CM12	1 : 10k	7287,35	6,3%	1:10	45,00	1,03	
CM13	1 : 10k	13261,53	6,3%	1:20	95,00	1,13	
CM14	1 : 10k	13333,11	6,3%	1:20	95,00	1,13	
CM15	1 : 10k	3673,68	6,3%	1:5	20,00	1,02	
CM16	1 : 10k	2641,17	6,3%	1:5	20,00	1,42	
CM17	1 : 10k	1083,02	6,3%	1:5	20,00	3,46	
CM18	1 : 10k	3825,02	6,3%	1:10	45,00	1,96	
CM19	1 : 10k	1939,15	6,3%	1:5	20,00	1,93	
CM20	1 : 10k	9951,22	6,3%	1:20	95,00	1,51	
CM21	1 : 10k	7330,08	6,3%	1:10	45,00	1,02	
CM22	1 : 10k	3080,45	6,3%	1:5	20,00	1,22	
CM23	1 : 10k	9956,46	6,3%	1:20	95,00	1,51	
Total library vol (μL):						26,79	

Tabla A7. Tercer *pool* de secuenciación con 16 muestras, todas de CCM.

Assay Type: mRNA		Loading Concentration: 20 pM					
Sample name	Sample dilution factor	Library concentration (pM)	% of total pool	Library dilution factor	Diluent (μL) (10 mM Tris pH 8.5)	Volume of diluted library to pool (μL)	Clean-up well location
CM24	1 : 10k	2627,51	6,3%	1:5	20,00	1,43	
CM25	1 : 10k	2417,22	6,3%	1:5	20,00	1,55	
CM26	1 : 10k	3189,08	6,3%	1:5	20,00	1,18	
CM27	1 : 10k	1992,51	6,3%	1:5	20,00	1,88	
CM28	1 : 10k	532,34	6,3%	1:1	Use Neat	1,41	
CM29	1 : 10k	1621,14	6,3%	1:5	20,00	2,31	
CM30	1 : 10k	1973,10	6,3%	1:5	20,00	1,90	
CM31	1 : 10k	4397,66	6,3%	1:10	45,00	1,71	
CM32	1 : 10k	2086,08	6,3%	1:5	20,00	1,80	
CM33	1 : 10k	385,32	6,3%	1:1	Use Neat	1,95	
CM34	1 : 10k	236,99	6,3%	1:1	Use Neat	3,16	
CM35	1 : 10k	376,00	6,3%	1:1	Use Neat	1,99	
CM36	1 : 10k	1087,32	6,3%	1:5	20,00	3,45	
CM37	1 : 10k	1223,61	6,3%	1:5	20,00	3,06	
CM38	1 : 10k	793,44	6,3%	1:5	20,00	4,73	
CM40	1 : 10k	2277,25	6,3%	1:5	20,00	1,65	
Total library vol (μL):						35,15	

Tabla A8. Cuarto *pool* de secuenciación con 16 muestras, 9 de CCM. También se incluyen 7 repeticiones

Assay Type: mRNA		Loading Concentration: 20 pM					
Sample name	Sample dilution factor	Library concentration (pM)	% of total pool	Library dilution factor	Diluent (μL) (10 mM Tris pH 8.5)	Volume of diluted library to pool (μL)	Clean-up well location
CM41	1 : 10k	373,06	6,3%	1:1	Use Neat	2,01	
CM42	1 : 10k	138,46	6,3%	1:1	Use Neat	5,42	
CM43	1 : 10k	421,49	6,3%	1:1	Use Neat	1,78	
CM44	1 : 10k	1115,07	6,3%	1:5	20,00	3,36	
CM45	1 : 10k	848,52	6,3%	1:5	20,00	4,42	
CM46	1 : 10k	4865,14	6,3%	1:10	45,00	1,54	
CM47	1 : 10k	3112,17	6,3%	1:5	20,00	1,20	
CM48	1 : 10k	2267,51	6,3%	1:5	20,00	1,65	
CM49	1 : 10k	189,81	6,3%	1:1	Use Neat	3,95	
CM12rep	1 : 10k	3749,36	6,3%	1:5	20,00	1,00	
CM22rep	1 : 10k	1724,34	6,3%	1:5	20,00	2,17	
CM23rep	1 : 10k	2192,50	6,3%	1:5	20,00	1,71	
CM31rep	1 : 10k	3237,87	6,3%	1:5	20,00	1,16	
CM32rep	1 : 10k	2586,69	6,3%	1:5	20,00	1,45	
CM44rep	1 : 10k	2214,05	6,3%	1:5	20,00	1,69	
CM48rep	1 : 10k	2169,67	6,3%	1:5	20,00	1,73	
Total library vol (μL):						36,26	